



UNIVERSITÀ DI PISA

UNIVERSITÀ DI PISA

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

TESI DI DOTTORATO IN

FISIOPATOLOGIA MEDICA E FARMACOLOGIA

TITOLO

**VALUTAZIONE DEL RISCHIO DI LEUCOENCEFALOPATIA
MULTIFOCALE PROGRESSIVA IN PAZIENTI CON LINFOMA NON-
HODGKIN ESPOSTI A RITUXIMAB**

Relatore

Chiar.mo Prof. Corrado Blandizzi

Candidato

Dott. Marco Tuccori

Anno Accademico 2009/2010

Settore Sceintifico Disciplinare BIO 14

INDICE

PARTE GENERALE	3
1. Introduzione	4
2. Rituximab: efficacia e tollerabilità	6
2.1 Proprietà farmacologiche	7
2.2 Efficacia terapeutica	7
2.2.1 Linfoma non-Hodgkin indolente	7
2.2.2 Linfoma non-Hodgkin aggressivo	9
2.2.3 Leucemia linfocitica cronica	11
2.3 Tollerabilità	11
3. Leucoencefalopatia multifocale progressiva	13
3.1 Epidemiologia	14
3.2 Biologia	15
3.3 Patogenesi	19
3.4 Immunità umorale	20
3.5 Immunità cellulare	21
3.6 Segni clinici e sintomi	22
3.7 Diagnosi	25
3.8 Terapia	30
3.9 Prognosi	33
4. Rituximab e PML	35
PARTE SPERIMENTALE	39
5. Obiettivi	40
6. Metodi	41
7. Risultati	44
7.1 PML in pazienti trattati con rituximab presso l'Unità Operativa di Ematologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana	44
7.1.1 Case report 1	45
7.1.2 Case report 2	45
7.1.3 Case report 3	46
7.1.4 Case report 4	47
7.1.5 Case report 5	48
7.2 <i>Incidence rate</i> di PML nei pazienti NHL trattati con rituximab e confronto con la letteratura	50
7.3 Rischio di PML nei pazienti NHL esposti a rituximab rispetto ai non esposti	52
8. Discussione	55
9. Conclusioni	58
Bibliografia	60
Glossario	86

PARTE GENERALE

1. INTRODUZIONE

La leucoencefalopatia multifocale progressiva (*progressive multifocal leukoencephalopathy* - PML) è l'unica patologia virale umana demielinizzante conosciuta [Weber and Mayor, 1997]. La PML è causata dal poliomavirus JC (JCV). Il suo nome deriva dalle iniziali del primo paziente (John Cunningham) dal cui cervello è stato isolato il virus [Padgett et al., 1971]. La patologia fu descritta per la prima volta dal neuropatologo tedesco Hallervorden il quale non riuscì ad identificare la PML come entità nosologica distinta, ma la definì "inclassificabile" [Hallervorden, 1930]. Åström e coll. [Åstrom et al., 1958] coniarono il termine PML dopo l'identificazione di patologie croniche immuno-soppressive quali la malattia di Hodgkin, il linfoma non-Hodgkin, le leucemie linfatiche croniche e una possibile infezione virale. Cavanagh e coll. nel 1959 identificarono alcune inclusioni intranucleari come ulteriore evidenza di una causa virale della PML [Cavanagh et al., 1959]. Nel 1965, Zu Rhein e coll. [Zu Rhein et al., 1978] dimostrarono inclusioni intranucleari particellari simili al papovavirus. Sette anni dopo, Padgett all'Università del Wisconsin isolò con successo il virus JC dal cervello di un paziente [Padgett et al., 1971]. Nel 1984, Frisque e coll. [Frisque et al., 1984] pubblicarono la prima sequenza completa di RNA di questo virus, chiamato Mad-1. L'espandersi della pandemia di AIDS ha portato ad un incremento notevole dei casi di PML [Miller et al., 1982]. Ancora oggi, circa l'83% dei pazienti che sviluppa PML è affetta da AIDS [Eng et al., 2006]. Una percentuale compresa tra il 3% e il 5% degli individui HIV-positivi sviluppa PML [San-Andres et al., 2003].

L'infezione produttiva causata da JCV (il virus esce dalla fase di latenza e inizia a replicarsi e ad infettare le cellule) determina la comparsa di numerosi piccoli focolai di demielinizzazione che tendono a confluire. Le lesioni si sviluppano principalmente nella sostanza bianca, ma possono interessare anche la sostanza grigia [Jellinger et al., 2000]. Almeno un terzo dei casi mostra infiltrazioni di cellule rotonde negli spazi perivascolari che indicano una reazione immunitaria aspecifica [Jellinger et al., 2000, Neuenburg et al.,

2002]. L'introduzione della terapia antiretrovirale ad elevata efficacia (*highly active antiretroviral therapy*, HAART) ha determinato un cambiamento nel decorso clinico della PML. Infatti in pazienti con AIDS e PML, dopo l'inizio della terapia HAART, si sviluppa una marcata risposta immunitaria denominata "sindrome infiammatoria da immunoricostruzione" (*immune reconstitution inflammatory syndrome* - IRIS) [Venkataramana et al., 2006, Hoffman et al., 2003]. Nella IRIS, le lesioni infiammatorie focali sono visualizzate alla risonanza magnetica (*magnetic resonance imaging*, MRI) come aree captanti gadolinio, mentre nella PML questo tipo di lesioni è stato osservato solo nel 15% dei casi [Venkataramana et al., 2006, Berger et al., 1998, Lima et al., 2005]. Queste lesioni possono colpire un intero emisfero cerebrale e appaiono molto intense dopo acquisizione dell'immagine in modalità T2. Raramente le lesioni sono diffuse. Le aree cerebrali più colpite sono le regioni paraventricolari e subcorticale dei lobi parietale-occipitale e frontale [Whiteman et al., 1993]. I segni clinici e i sintomi della PML sono molteplici e aspecifici. Mono o emiparesi predominano, seguiti da varie forme di afasia e disturbi di deambulazione e postura [Brooks and Walker, 1984, Berenguer et al., 2003]. Non ci sono evidenze di una terapia efficace per la PML in pazienti affetti da AIDS o da altre patologie immunosoppressive [Roskopf et al., 2006].

Virtualmente tutti i farmaci dotati di attività immunosoppressiva possono innescare l'infezione produttiva da JCV. Nel 2005, la PML è diventata argomento d'interesse farmacologico, poiché è stata osservata in due pazienti con sclerosi multipla e in un paziente con morbo di Crohn trattati con l'anticorpo monoclonale natalizumab in grado di neutralizzare l'integrina $\alpha 4/\beta 1$ [Sandborn et al., 2005-Kleinschmidt-Demasters and Tyler, 2005]. Il ruolo dei linfociti nello sviluppo della PML è sostenuto anche da almeno 25 casi di PML in pazienti trattati con rituximab, un anticorpo monoclonale diretto contro il recettore CD20 [Genetech, 2005]. La valutazione del rischio di sviluppare PML in seguito a trattamento con rituximab è attualmente oggetto di indagine.

2. RITUXIMAB: EFFICACIA E TOLLERABILITÀ

Rituximab è un anticorpo monoclonale che induce lisi e apoptosi delle cellule B sane e tumorali e sensibilizza quelle tumorali nei confronti dell'effetto citotossico della chemioterapia. In studi clinici di fase III su pazienti con linfoma non-Hodgkin (LNH) indolente o aggressivo a cellule B, l'associazione di rituximab con la chemioterapia convenzionale è risultata più efficace, come terapia di prima o seconda linea rispetto alla chemioterapia da sola, nel promuovere il miglioramento della salute del paziente e il prolungamento della sopravvivenza. Analogamente, in pazienti con leucemia linfocitica cronica (LLC), l'associazione di rituximab con la chemioterapia sembra più efficace della chemioterapia da sola come trattamento di prima o seconda linea. Inoltre, la terapia di mantenimento con rituximab determina un miglioramento significativo della salute e un prolungamento della sopravvivenza nei pazienti affetti da linfoma non-Hodgkin indolente a cellule B o da LLC. L'associazione di rituximab con ciclofosfamide, doxorubicina, vincristina e prednisone (CHOP) mostra la stessa efficacia di un trattamento di prima o seconda linea nel trattamento di LNH a cellule B grandi rispetto allo schema CHOP. Da solo rituximab, sia in monoterapia che in associazione con la chemioterapia, è generalmente ben tollerato dai pazienti affetti da LNH e da LLC. Esso rappresenta quindi un'importante alternativa come terapia di prima o seconda linea ed è compreso nelle linee guida per il trattamento di queste patologie [Risto et al., 2006].

2.1 Proprietà farmacologiche

Rituximab è un anticorpo monoclonale chimerico diretto contro gli antigeni di superficie CD20 espressi dalle cellule B sane, da più del 90% delle cellule B nel LNH e da circa il 14% delle cellule B nella LLC. Il farmaco induce lisi e apoptosi di tutte le cellule B CD20+ e sensibilizza le cellule B tumorali nei confronti dell'effetto citotossico della chemioterapia. Alle dosi terapeutiche, rituximab causa una rapida e grave leucopenia da cellule B

nella maggior parte dei pazienti, che sopravvive per oltre 6 mesi e guarisce entro 9-12 mesi dalla fine del trattamento. Questi risultati suggeriscono che la terapia di mantenimento con rituximab sia efficace per la soppressione delle cellule B tumorali [Risto et al., 2006].

In seguito alla somministrazione per via endovenosa di rituximab in pazienti con LNH a cellule B, la concentrazione ematica risulta direttamente proporzionale alla dose e inversamente correlata al livello assoluto di cellule B periferiche circolanti e alle misure di diffusione del tumore rispetto al basale. La farmacocinetica di rituximab è caratterizzata dall'accumulo di farmaco in seguito a somministrazioni ripetute e può avere profili diversi in base alla variabilità individuale. Le concentrazioni ematiche di rituximab rimangono a livelli terapeutici fino a sei mesi e, durante il periodo di trattamento con rituximab, il farmaco si trova a concentrazioni misurabili anche nel sistema nervoso centrale (SNC). La farmacocinetica di rituximab mostra profili simili anche in pazienti con LNH a cellule B diffuse o follicolari che non sono sottoposti a schemi di trattamento CHOP. Concentrazioni molto basse di rituximab sono presenti in pazienti con la forma linfomatosa di LLC a cellule B, rispetto a quelle dei pazienti con LNH a cellule B. [Risto et al., 2006]

2.2 Efficacia terapeutica

2.2.1 Linfoma non-Hodgkin indolente: negli studi di fase III su pazienti con LNH follicolare in stadio avanzato, non sottoposti ad alcuna chemioterapia, la somministrazione di rituximab 375 mg/m² per via endovenosa per 6-8 cicli di chemioterapia è risultata molto più efficace nell'indurre la remissione completa a breve termine (2.5 anni) e della sopravvivenza libera da eventi (EFS) rispetto alla chemioterapia da sola. In associazione a ciclofosfamide, vincristina e prednisone (CVP), rituximab prolunga il tempo in cui si osserva una risposta alla terapia (più del doppio), il tempo libero da fallimento terapeutico di circa quattro volte, la sopravvivenza libera da malattia (DFS) e rallenta la progressione della malattia più del doppio. Ad una valutazione di follow-up di tre anni questi effetti non

hanno tuttavia determinato una sopravvivenza globale (Overall Survival, OS) significativamente superiore a quella osservata per la sola terapia CVP (89% vs 81%), sebbene entrambi i risultati siano clinicamente rilevanti. Tuttavia è importante sottolineare che i pazienti trattati con rituximab in associazione allo schema CVP presentano un tempo libero da sintomi della malattia o da tossicità significativamente superiore e sostanzialmente una migliore sopravvivenza aggiustata per parametri di qualità rispetto ai pazienti che assumono la sola CVP. Nei pazienti affetti da LNH follicolare avanzato, la terapia di prima linea con rituximab in associazione con mitoxantrone, clorambucile e prednisone (MCP) determina un aumento del tempo di sopravvivenza libera da progressione (PFS) e della OS rispetto allo schema MCP da solo [Hiddeman et al., 2005; Herold et al., 2005; Solal-Caligny et al., 2005; Salles et al., 2004; Baltazar et al., 2005]. In due studi clinici di fase III è stato osservato che l'aggiunta di una singola dose di rituximab ad ognuno dei sei cicli di terapia CHOP o a quattro cicli di fludarabina, ciclofosfamide e mitoxantrone (FCM), come terapia di seconda linea in pazienti con LNH follicolare refrattario o con recidive, migliora in modo significativo i tempi di remissione completa e della risposta oggettiva, e aumenta la PFS rispetto alla chemioterapia da sola. Un aumento significativo dell'OS di 4 anni è stato evidenziato anche da studi clinici sulla chemioterapia FCM [Forstpointner et al., 2004; Van Oers et al., 2005; Dreyling et al., 2005].

L'aumento significativo della sopravvivenza legato all'introduzione di rituximab in associazione a chemioterapia standard di prima e seconda linea in pazienti con LNH follicolare è stato confermato anche in una meta-analisi di dati ottenuti in alcuni studi clinici randomizzati di fase III. In monoterapia, quattro somministrazioni settimanali di rituximab 375 mg/m² per via endovenosa hanno determinato un aumento clinicamente rilevante dei tassi di remissione completa (complete response, CR) e di remissione oggettiva (objective response, OR) in pazienti affetti da LNH a cellule linfoidi B della mucosa. Uno degli studi ha mostrato una sopravvivenza libera da fallimento terapeutico

raddoppiata ($p=0.001$) in pazienti trattati con rituximab in monoterapia *naive* per la chemioterapia rispetto a pazienti precedentemente esposti a chemioterapia [Marcus et al., 2005; Shulz et al., 2005]. Allo stesso modo, la terapia di mantenimento con rituximab 375 mg/m² (quattro somministrazioni per via endovenosa una volta alla settimana ogni sei mesi o una singola somministrazione ogni due o tre mesi, per più di due anni o fino alla comparsa di recidiva), ha mostrato un aumento significativo di CR e/o OR, del periodo di remissione, dell'EFS e del PFS dopo la terapia di induzione in pazienti affetti da LNH follicolare o LLC (forma linfomatosa), rispetto al ri-trattamento con rituximab (alla progressione, studi di fase II) o al non trattamento (studi di fase III). La terapia di mantenimento con rituximab determina un aumento del PFS e dell'OS di tre o quattro anni sia nei pazienti precedentemente trattati che in quelli non trattati con LNH follicolare, mentre i dati ottenuti sottoponendo i pazienti ad un nuovo trattamento non sono significativamente diversi (72% vs 68%) [Ghielmini et al., 2004; Hainsworth et al., 2005; Hochster et al., 2005].

2.2.2 LNH aggressivo: in diversi studi clinici di fase III l'associazione di rituximab 375 mg/m² per via endovenosa con la terapia CHOP o una terapia simile, per 6-8 cicli, è risultata più efficace rispetto alla chemioterapia da sola come trattamento di prima scelta nei pazienti affetti da LNH a cellule B diffuse allo stadio avanzato o affetti da linfoma delle cellule mantellari (LCM). Indipendentemente dall'età dei pazienti con LNH a cellule B diffuse, l'introduzione del trattamento con rituximab aumenta in modo significativo la CR e la sopravvivenza libera da fallimento terapeutico di due o tre anni e l'OS da due a cinque anni (quest'ultimo effetto si riscontra solo nei pazienti a basso rischio). Un aumento di cinque anni del PFS è stato osservato anche in studi clinici condotti su pazienti anziani sottoposti a trattamento con rituximab associato allo schema chemioterapico CHOP (età ≥ 60 anni) indipendentemente dalla prognosi della patologia. Nei pazienti più giovani (età $<$

60 anni) con malattia a basso rischio, rituximab, somministrato in associazione allo schema CHOP o ad una terapia simile, riduce il rischio relativo di fallimento terapeutico (del 64%) rispetto alla chemioterapia da sola [Feugier et al., 2005; Habermann et al., 2005; Pfreundschuh et al., 2005].

In due studi clinici di fase III randomizzati stato osservato un aumento significativo della sopravvivenza libera da fallimento terapeutico di un anno o dell'OS di quattro anni in pazienti affetti da LCM trattati con rituximab 375 mg/m² per via endovenosa in associazione al trattamento CHOP di prima linea (sei cicli) o al trattamento FCM di seconda linea (quattro cicli), rispetto ai pazienti sottoposti alla chemioterapia da sola. Una meta-analisi dei dati ottenuti nei due studi conferma i benefici ottenuti in termini di OS in seguito all'aggiunta di rituximab alla chemioterapia in pazienti affetti da LCM. In entrambi gli studi i pazienti non erano stati precedentemente trattati e non presentano recidive o refrattarietà della LCM [Kaplan et al., 2005].

In uno studio clinico di fase III randomizzato è stato osservato che rituximab non migliora la risposta al trattamento o la sopravvivenza in pazienti affetti da LNH a cellule B aggressivo associato ad HIV, ma aumenta il rischio di morte per tutte le cause legate all'infezione, al contrario di quanto osservato negli studi precedenti di fase I e fase II che avevano evidenziato efficacia terapeutica in questa popolazione. La terapia di mantenimento con rituximab è risultata efficace nei pazienti con LNH a cellule B diffuse, solo se non compresa in un regime di induzione, e non è efficace in pazienti con LCM.

2.2.3 Leucemia linfocitica cronica: in uno studio clinico di fase II è stato osservato che in pazienti con LLC a cellule B la monoterapia standard con rituximab 375 mg/m² (quattro somministrazioni per via endovenosa una volta alla settimana), è più efficace della monoterapia con fludarabina. Tuttavia, da analisi retrospettive comparative di diversi studi clinici di fase II e III è emerso che rituximab 375 o 500 mg/m² associato a sei cicli di

fludarabina (associato o no a ciclofosfamide) migliora significativamente la risposta (CR e/o OR) e la sopravvivenza (da due a quattro anni di PFS e/o OS) in questi pazienti, rispetto a quanto osservato con la chemioterapia da sola [Byrd et al., 2003; Keating et al., 2005; O'brien et al., 2001; Wierda et al., 2005; Byrd et al., 2005., Rai et al., 2000].

2.3 Tollerabilità

Dagli studi clinici è stato rilevato che rituximab in monoterapia o in associazione alla chemioterapia è ben tollerato dai pazienti affetti da LNH a cellule B aggressivo o indolente e da quelli affetti da LLC a cellule B. Gli eventi avversi più comuni emersi negli studi clinici sono reazioni associate al sito di iniezione, eventi avversi ematologici e infezioni. Le reazioni correlate all'infusione, riscontrabili nella maggior parte dei pazienti, soprattutto entro due ore dalla prima somministrazione, consistono generalmente in una sintomatologia simil-influenzale, lieve o moderata, che si risolve con infusioni più lente di farmaco o con la sospensione del trattamento e divengono meno frequenti con le successive somministrazioni. Tra le reazioni gravi (di grado 3-4) è emersa la sindrome da liberazione di citochine, in circa il 10% dei pazienti, che spesso richiede specifici interventi terapeutici (analgesici, antistaminici, ossigeno, terapia endovenosa, broncodilatatori, vasocostrittori e/o corticosteroidi).

Rispetto alla chemioterapia classica, rituximab determina una minore incidenza di infezioni e di neutropenia grave. Inoltre, l'introduzione di rituximab non potenzia la tossicità della chemioterapia convenzionale in pazienti affetti da LNH a cellule B o da LLC a cellule B e il profilo di tollerabilità è simile nei pazienti affetti da LNH aggressivo e in quelli affetti da LNH indolente [Genentech, 2006; Roche, 2006]. Altri eventi avversi rilevanti anche se rari sono rappresentati da reazioni letali associate all'infusione, dalla sindrome da lisi tumorale dalle reazioni mucocutanee gravi [Risto et al., 2006].

Nel 2006, una nota diffusa dalla FDA segnalava l'insorgenza di casi fatali di PML in pazienti che erano stati trattati con rituximab per la terapia del lupus eritematoso sistemico. A questa nota hanno fatto seguito delle “dear doctor letter” e l'aggiornamento della scheda tecnica di rituximab [FDA alert, 2006]. Da allora sempre maggiore attenzione è stata dedicata dai ricercatori e dai clinici alla possibile associazione tra PML e rituximab.

3. LEUCOENCEFALOPATIA MULTIFOCALE PROGRESSIVA

3.1 Epidemiologia

Prima della pandemia di AIDS l'incidenza di PML era di 0.15 casi per milione di abitanti/anno. Con il diffondersi dell'AIDS, l'incidenza si è quadruplicata [Holman et al., 1991]. Tra i farmaci più comunemente associati allo sviluppo di PML sono compresi i corticosteroidi (40% dei casi), seguiti da chemioterapici antitumorali (16%); nella metà dei pazienti non è stata identificata alcuna causa farmacologica [Eng et al., 2006]. Dopo l'AIDS, patologie linfoidi e mieloproliferative, tumori solidi e patologie immunodeficitarie congenite sono la causa principale di PML (4,5% dei casi) [Eng et al., 2006]. Raramente, malattie granulomatose croniche come tubercolosi o sarcoidosi causano PML.

Dato che approssimativamente l'85% dei casi di PML presenta un'infezione basale da HIV, la maggior parte dei dati disponibili derivano da studi di pazienti HIV-positivi con PML [Skromne et al., 2006-De Luca et al., 2001]. L'efficacia nell'ottenere la riduzione della carica virale di HIV e, conseguentemente, nel contrastare lo stato di immunosoppressione è il fattore più importante in grado di determinare l'aumento della sopravvivenza nei pazienti con PML trattati con HAART rispetto a quanto rilevato da controlli storici prima della pandemia di AIDS [Berenguer et al., 2003, Silva et al., 2005-Elliot et al., 1997]. Prima dell'introduzione della HAART, l'incidenza di PML nei pazienti affetti da AIDS negli Stati Uniti e in Europa risultava costante [San-Andres et al., 2003, Sacktor et al., 2001]. L'introduzione della HAART ha favorito ad un aumento significativo del tempo medio di sopravvivenza, pari a 4.5 anni in pazienti affetti da AIDS con carica cellulare CD4 superiore a 100/ μ L, e a 3.4 anni in quelli con carica cellulare inferiore a 100/ μ L [Berenguer et al., 2003]. Ci sono evidenze di una riduzione della mortalità e di un prolungamento del periodo libero da PML in pazienti HIV-negativi con patologie

linfoproliferative, quali il morbo di Hodgkin e il linfoma non-Hodgkin [Garcia-Suarez et al., 2005]. Inoltre alcune terapie antineoplastiche quali i trattamenti con analoghi purinici e le chemioterapie a dosi elevate in associazione a trapianto di cellule staminali, sembrano ridurre l'incidenza di PML e promuovere un rallentamento dell'insorgenza della patologia (Tabella 1) [Garcia-Suarez et al., 2005]. L'anticorpo monoclonale natalizumab sembra essere associato al rischio di sviluppo di PML con un tasso dello 0.1% (circa 1 paziente su 1000 trattati) in un periodo di 18 mesi [Yousry et al., 2006].

Tabella 1: Farmaci e trattamenti associati a PML

Trattamento	Farmaci	Bersaglio molecolare
Glucocorticoidi orali	Tutti	Diversi meccanismi
Agenti alchilanti	Ciclofosfamide Carmustine Dacarbazina	DNA
Analoghi purinici	Fludarabina Cladribina Azatioprina	DNA
Antimetaboliti	Metotrexato	inibitore del metabolismo dell'acido folico
Anticorpi monoclonali	Rituximab Infliximab Etanercept Natalizumab Basiliximab Daclixumab Muromonab-cd3	CD20 TNF- α TNF- α VLA-4 IL-2Ra IL-2R CD3
Immunosoppressori	Cidosporina Tacrolimus Sirolimus Micofenolato	cidofilina calcineurina mTOR inosina monofosfato

Il JCV è diffuso in tutto il mondo. Circa l'80% della popolazione mondiale adulta presenta anticorpi contro di esso ed è stata quindi soggetta ad una infezione asintomatica [Weber and Major, 1997]. Studi di sierologia hanno rilevato una distinzione tra JCV e BKV (un poliomavirus della stessa famiglia di JCV), dato che non sussistono reazioni sierologiche crociate tra la proteina VP1 del capsido di JCV e la proteina analoga di BKV [Hamilton et al., 2000]. La clonazione di entrambe le VP1 di JCV e BKV permette oggi un semplice, economico e rapido screening per mezzo di saggi immunoenzimatici (ELISA) [Hamilton et al., 2000, Weber et al., 1994]. Sono stati identificati almeno 14 genotipi di JCV. La genotipizzazione di JCV è stata utilizzata per studiare l'evoluzione umana, poiché si ritiene che il processo di divergenza evolutiva tra ospite (uomo) e virus sia progredito con la stessa velocità [Agostini et al., 1997]. Studi più recenti non sostengono queste ipotesi e suggeriscono una progressione della divergenza di JCV di circa due ordini di grandezza più veloce rispetto a quella del genoma umano [Shackelton et al., 2006].

3.2 Biologia

JCV è un virus a DNA circolare a doppio filamento e fa parte della famiglia dei poliomavirus. La particella virale ha un diametro di circa 45 nm e forma di icosaedro. Il capsido virale contiene tre proteine denominate particelle virali (VP), VP1, VP2 e VP3. VP1 rappresenta il 75% delle proteine del capsido. VP1 forma particelle virus-simili (VLPs) indipendentemente da VP2 e VP3 [Goldmann et al., 1999, Goldmann et al., 2000]. A scopo diagnostico VP1 può essere utilizzata come un antigene per il rilevamento di risposte umorali JCV-specifiche e/o risposte cellulo-mediate [Goldmann et al., 1999, Goldmann et al., 2000]. La prima sequenza di JCV isolata è stata il ceppo Mad con 5130 paia di basi [Frisque et al., 1984]. Il genoma circolare viene letto da una DNA polimerasi in entrambe le direzioni, cioè in senso "orario" e "antiorario" (Figura 1) [Weber and Major, 1997, Okada et al., 2001]. I geni ad induzione rapida (early genes) T e t sono trascritti da

un singolo filamento di DNA a partire dal punto di origine della replicazione (ORI). L'antigene T (T-Ag) è una proteina multifunzionale che trasforma le cellule attraverso l'interazione con vari geni che regolano la crescita cellulare [Khalili, 2001, White et al., 2005] ed è stato a lungo conosciuto come induttore di tumore cerebrale [Bollag et al., 1989, Dorries, 1997].

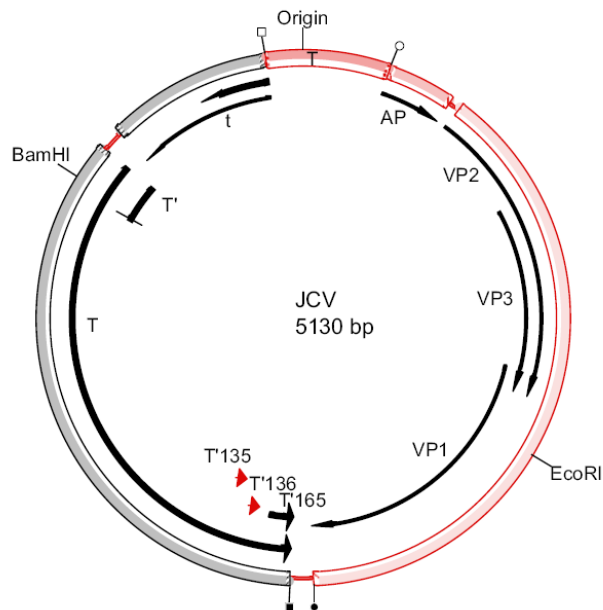


Figura 1: Mappa circolare del genoma di JCV. L'origine è affiancata dagli *early genes* a sinistra e dai geni ad induzione lenta (*delayed genes*) a destra. Gli *early genes* "*t*", "*T*" e le ultime tre varianti di splicing sono denominate *T'* e designate secondo il numero degli amminoacidi *T'*₁₆₅, *T'*₁₃₆ e *T'*₁₃₅.

- indica il codone d'inizio di *t* e *T*,
- indica il codone di stop di *T*.
- indica il codone d'inizio degli ultimi geni;
- indica il codone di stop dell'ultimo gene *VP1*.

AP: agnoproteina, *VP1*: proteina virale 1, *VP2*: proteina virale 2, *VP3*: proteina virale 3

I *delayed genes* che codificano per *VP1*, *VP2*, *VP3* e agnoproteina sono letti nel filamento specifico [Frisque et al., 1984]. L'agnoproteina è un polipeptide con di 71 amminoacidi che agisce come inibitore della crescita cellulare e arresta il ciclo cellulare nella fase G2/M [Darbinyan et al., 2002]. Inoltre, questa proteina sopprime la replicazione del DNA indotta

dalla proteina T e promuove l'assemblaggio del capside virale [Safak et al., 2001]. Le cellule infettate producono ulteriori proteine denominate T135, T136 e T165 che derivano dalla sequenza del gene T attraverso uno splicing alternativo del mRNA virale precursore. Queste proteine alterano lo stato di fosforilazione delle proteine p107 e p130 inattivando i geni regolatori del ciclo cellulare e promuovendo la trasformazione cellulare indotta da JCV [Bollag et al., 2006]. Esse partecipano inoltre alla replicazione del DNA di JCV e regolano le funzioni della proteina T [Fisque, 2001]. La proteina T, a sua volta, interagisce con la proteina oncosoppressiva p53 e con la proteina pRb regolatrice del ciclo cellulare [Henson et al., 1995, Bollag et al., 2000]. In base a certi polimorfismi, la proteina p53 inibisce la replicazione del virus JC o non interferisce con la sua replicazione [Staib et al., 1996]. Le interazioni con queste proteine regolatrici possono determinare la lisi cellulare, l'induzione di cellule tumorali e la crescita incontrollata di queste.

La replicazione e la trascrizione del DNA sono regolate da interazioni di complessi cellulose-specifici di varie proteine e fattori che legano il DNA [Raj and Khalili, 1995; Safak and Khalili, 2001]. Il più importante gruppo di proteine è rappresentato dai fattori di trascrizione NF-kappa B e NF-1 [Devireddy et al., 2000-Sumner et al., 1996]. La possibilità di replicazione di JCV sembra dipendere dal profilo di espressione cellulare della famiglia dei fattori di trascrizione NF-1 ed in particolare dall'espressione di NF-1X (nota anche come NF-1D) [Monaco et al., 2001]. È stato recentemente dimostrato che c-Jun, un membro della famiglia delle proteine AP-1 leganti il DNA, regola l'attività di JCV legandosi a NF-1 [Ravichandran et al., 2006].

Nei modelli animali JCV ha dimostrato di poter indurre vari tumori cerebrali quali il glioblastoma multiforme (GBM) nella scimmia gufo, nel criceto e nel ratto e tumori neuroectodermici medulloblastoma/primitivi (PNET) in topi transgenici per gli *early genes* di JCV [Khalili, 2001, Ohsumi et al., 1986-Krynska et al., 1999]. Per mezzo della PCR e di altri metodi di amplificazione del DNA, il DNA di JCV è stato evidenziato in colonie

cellulari, cellule stromali e linfociti delle tonsille [Ricciardiello et al., 2001, Monaco et al., 1998]. Queste ed altre osservazioni hanno permesso di ipotizzare un ruolo di JCV nello sviluppo di varie tipologie di tumori, quali il carcinoma del colon, il glioblastoma multiforme, l'oligodendroglioma, il ganglioma, il medulloblastoma, il mesotelioma e i linfomi non-Hodgkin [Croul et al., 2003]. Tuttavia, attualmente non sono disponibili evidenze conclusive a sostegno di un ruolo eziopatogenetico di JCV nello sviluppo di questi o altri tumori [Newcomb et al., 2004, Gillison et al., 2007]. Per quanto riguarda i tumori astrogliali dell'uomo, sebbene in pazienti positivi agli anticorpi IgG anti-VP1 di JCV l'odds ratio per lo sviluppo di patologie neoplastiche sia leggermente più alto di 1, le evidenze definitive attuali non sono sufficienti a stabilire un'associazione tra questi tumori e JCV [Rollison et al., 2003]. Tuttavia, dati sierologico-epidemiologici sembrano suggerire un aumento del rischio di sviluppo di linfoma non-Hodgkin in presenza di aumenti dei titoli anticorpali per JCV aumentati [Rollison et al., 2006]. Resta in ogni caso da dimostrare una relazione tra questo dato e un ruolo eziologico diretto di JCV nello sviluppo del linfoma non-Hodgkin. Inoltre, un polimorfismo nel codone 72 dell'esone 4 della proteina p53 sembra essere associato allo sviluppo di PML in pazienti HIV-positivi o con AIDS conclamato [Power et al., 2000].

JCV si lega ad almeno due recettori sulla superficie cellulare. Uno presenta residui di acido sialico legati in posizione terminale alfa-2,6 [Liu et al., 1998]. Questi residui sono stati trovati anche in altre sialoglicoproteine, quali glicoproteina acida alfa-1, fetuina (una glicoproteina prodotta a livello epatico e deputata al controllo delle concentrazioni extracellulari del calcio) e recettore della transferrina [Komagone et al., 2002]. Nel tessuto cerebrale umano sano, i recettori dotati di questi residui sono presenti negli oligodendrociti e negli astrociti ma non nei neuroni corticali e la loro espressione è più elevata nei linfociti B, rispetto ai linfociti T [Eash et al., 2004]. I livelli più alti di espressione nelle cellule B rispetto ai linfociti T situati nella milza e nelle tonsille umane sane, rafforzano

ulteriormente l'ipotesi di una captazione virale attraverso la via respiratoria con persistenza nei tessuti linfoidi e diffusione al cervello per mezzo delle cellule B [Eash et al., 2004, Sabath and Major, 2002]. Diversamente da SV-40, i virioni JC penetrano nelle cellule gliali attraverso l'endocitosi mediata da recettori clatrina-dipendenti [Pho et al., 2000]. Il sottotipo recettoriale 2A della serotonina (5-HT_{2A}), caratterizzato da elevata espressione in aree cerebrali prive di barriera ematoencefalica, ovvero, nel plesso corioideo e nell'area postrema, è stato indicato come un possibile recettore per la penetrazione cerebrale di JCV [Elphick et al., 2004]. Il recettore 5-HT_{2A} è espresso in cellule astrogliali normali, e si ritiene che esso sia deputato alla regolazione di funzioni gliali specifiche, quali la proliferazione degli astrociti e il controllo dello sviluppo delle vie serotoninergiche centrali, o alla modulazione della microcircolazione ematica attraverso la liberazione di molecole vasoattive da parte delle cellule astrogliali [Post et al., 1999]. È importante sottolineare che la proteina caveolina 1, una proteina strutturale particolarmente espressa nella caveole in complessi con il recettore 5-HT_{2A}, è coinvolta nell'endocitosi di JCV [Bhatnagar et al., 2004]. Sembra quindi sussistere una stretta correlazione tra l'espressione di recettori per JCV contenenti residui di acido sialico nelle cellule e la loro suscettibilità alle infezioni da JCV [Eash et al., 2004].

3.3 Patogenesi

La patogenesi della PML può essere suddivisa in tre fasi. La prima fase è quella di un'infezione primaria, non apparente. Le possibili vie di infezione sono la via respiratoria e/o quella oro-fecale [Zheng et al., 2004]. La seconda fase dell'infezione è quella di latenza nell'ospite umano. Il tessuto di latenza più probabile per JCV è rappresentato dal rene, che rappresenta la via di escrezione di JCV dall'organismo [Hogan et al., 1980-Chang et al., 2002]. La struttura genomica della variante di JCV ritrovata più comunemente nel rene è stata considerata come archetipo [Kitamura et al., 1990]. Altri probabili tessuti di latenza

virale sono il midollo osseo e la milza [Houff et al., 1988]. La terza e ultima fase, quella produttiva, è probabilmente innescata da alterazioni immunitarie e molecolari della regione regolatrice de DNA virale e determina una disseminazione ematogena di JCV nel cervello [Weber and Major, 1997].

3.4 Immunità umorale

L'infezione da JCV induce una risposta immunitaria umorale con produzione di IgG, dirette prevalentemente contro la proteina VP1, costituente del capsido [Weber et al., 1997, Rollison et al., 2003, Knowles and Sasnauskas, 2003]. Sembra che venga indotta contro JCV anche una risposta mediata da IgM. Il ruolo di questa risposta anticorpale è ancora sconosciuto, ma essa potrebbe rappresentare un indicatore di stimolazione antigenica attiva da parte di JCV in soggetti sani o essere il risultato di una reazione crociata aspecifica [Knowles et al., 1992]. In tutti i pazienti con PML descritti in letteratura è stato possibile rilevare anticorpi IgG specifici anti-JCV nel siero [Weber et al., 1997, Knowles et al., 1995, Sindic et al., 1997]. Gli anticorpi non rappresentano una protezione contro lo sviluppo di PML. Il test ELISA, basato sulla VP1 ricombinante di JCV come antigene, è in grado di evidenziare una sieropositività dell'84.5% [Weber et al., 1997]. Sebbene i titoli di IgG non siano significativamente diversi tra i soggetti di controllo (pazienti sani o con sclerosi multipla) e quelli con PML, la presenza intratecale di anticorpi IgG specifici contro VP1 di JCV può essere utilizzata per confermare la diagnosi di PML [Weber, 2001, Weber et al., 1997]. Come in altre infezioni virali del SNC, la produzione intratecale di anticorpi anti-JCV si sviluppa col tempo ed eccede il limite superiore (1.5) dell'indice dell'anticorpo, due o tre settimane dopo l'inizio della patologia [Sindic et al., 1997]. La diagnosi di PML attraverso l'evidenza intratecale di anticorpi IgG può essere ottenuta con una sensibilità del 76% e una specificità del 96,8% [Weber et al., 1997].

3.5 Immunità cellulare

Nel 1961 Richardson ipotizzò che la causa della PML potesse essere attribuita ad una compromissione del sistema immunitario [Richardson, 1961]. L'ipotesi si basava sull'osservazione di casi che mostravano anergia per reazioni di ipersensibilità di tipo ritardato nei confronti di antigeni come la tossina del tetano e il 2,4-dinitrofluorobenzene [Ellison, 1969, Knight et al., 1972]. Nel 1980, Willoughby e colleghi [Willoughby et al., 1980] osservarono una riduzione della capacità proliferativa dei linfociti in presenza di mitogeni, quali fitoemoagglutinina o concanavalina A, in 7 pazienti con PML. Inoltre, un'evidenza clinica ulteriore a sostegno del ruolo dell'immunoreattività cellulare deriva dalla comparsa preferenziale di PML in pazienti con patologie note per essere caratterizzate da una risposta immunologica cellulare alterata (ad esempio pazienti con linfoma o immunodepressi per trapianto d'organo). La comparsa di PML in pazienti con ipo- o agammaglobulinemia è comunque rara. In pazienti affetti da HIV la probabilità di sviluppare PML è inversamente correlata alla conta dei linfociti CD4+ [Berger et al., 1998]. Frye e colleghi [Frye et al., 1997] hanno osservato una ridotta proliferazione dei linfociti in pazienti con PML utilizzando virioni purificati di JCV. Metodi di clonazione molecolare e di espressione ricombinante di VP1 hanno permesso di ottenere quantità sufficienti di antigene stabile per analizzare la risposta immunitaria cellulare e umorale [Goldmann et al., 2000]. In pazienti affetti da PML, con o senza infezione da HIV, si osserva una ridotta proliferazione di linfociti e una ridotta produzione di interferone- γ (TH1) in seguito a stimolazione con VP1. La produzione di IL-10 (TH2) in pazienti con PML risulta elevata in pazienti HIV-positivi. Queste osservazioni suggeriscono una soppressione delle funzioni dei linfociti T-helper di tipo 1 [Weber et al., 2001]. Durante la reazione immunitaria contro l'infezione virale, i linfociti CD4+ riconoscono le proteine extracellulari del virus che sono state convertite in peptidi mediante digestione esogena e presentate dal complesso maggiore di istocompatibilità II (MHC-II) sulla superficie delle

cellule presentanti l'antigene. I linfociti T citotossici CD8⁺ (CTLs) riconoscono i peptidi virali sintetizzati nell'ambiente intracellulare, i quali vengono degradati a livello endogeno e sono presentati insieme al complesso di istocompatibilità di classe I sulla membrana di cellule infettate dal virus. I pazienti con risposta immunitaria specifica dei linfociti citotossici CD8⁺, che riconoscono MHC di classe I in associazione con l'antigene HLA 0201 di MHC di classe I, contro un epitopo JCV-VP1 specifico (p100), mostrano un tempo di sopravvivenza più prolungato [Koralnik, 2002, Lima et al., 2007]. In uno studio prospettico, Koralnik e colleghi [Koralnik et al., 2002] hanno rafforzato l'ipotesi di un ruolo protettivo dei CTLs JCV-specifici. Infatti 13 di 15 pazienti affetti da PML con CTLs JCV-specifici hanno sviluppato una PML "cronica" o quiescente, mentre 9 degli 11 pazienti senza CTLs JCV-specifici hanno avuto un decorso rapido della patologia e una sopravvivenza ridotta. L'identificazione precoce di CTLs JCV-specifici nella PML sembra avere un valore predittivo positivo per il controllo della PML [Du Pasquier et al., 2004]. La frequenza di linfociti T citotossici epitopo-specifici per JCV A*0201 non è significativamente differente tra individui sani, pazienti HIV-positivi e pazienti HIV-positivi con PML, e non può essere quindi utilizzata per diagnosticare la PML o monitorarne l'evoluzione [Koralnik, 2002].

3.6 Segni clinici e sintomi

Segni clinici e sintomi di PML non sono specifici. In circa il 25% dei casi, la PML si manifesta come fase iniziale dell'AIDS [Berger et al., 1998]. A causa del numero ridotto dei pazienti descritti e del carattere retrospettivo di tutti gli studi pubblicati finora, è stato variamente descritto un numero elevato di segni e sintomi quali manifestazioni iniziali della PML (Tabelle 2 e 3). [Berger et al., 1998, Brooks and Walker, 1984, Berguer et al., 2003, Berger and Concha, 1995, Weber et al., 1994]. Il sintomo più comune è la perdita di forza in un arto nel 52% dei casi. Approssimativamente nel 45% dei casi la PML viene

diagnosticata in seguito all'insorgenza di deficit cognitivi. Circa il 30% dei pazienti presenta altri disturbi del linguaggio e/o deficit della visione. Circa il 20% dei pazienti presenta alterazione della coordinazione nel movimento degli arti. Approssimativamente il 12% di tutti i pazienti presenta anche attacchi epilettici o cefalea, mentre il 10% dei pazienti ha alterazioni sensoriali (vedi Tabella 2). I segni clinici sono stati raccolti retrospettivamente in uno studio multicentrico spagnolo e sono stati confrontati con i risultati ottenuti precedentemente da Berenguer e colleghi (Tabella 3) [Berger et al., 1998, Berenguer et al., 2003]. Anche in questo caso la paresi o persino la paralisi e l'atassia emergono come i segni più comuni per la diagnosi di PML.

Tabella 2: Frequenza (%) dei segni clinici in pazienti affetti da AIDS con PML

Sintomi	Frequenza (%)	
	Berger et al., 1998	Berenguer et al., 2003
Paresi o paralisi	54	67
Anomalie della deambulazione	28	64
Disartria	24	–
Afasia	19	–
Danno dei nervi cranici	–	31
Anomalie della visione	17	20
Atassia	–	44

Tabella 3: Frequenza dei sintomi in pazienti affetti da PML rispetto ai pazienti affetti da sclerosi multipla

	Brooks e Walker, 1984	Berger et al., 1997	von Einsiedel et al., 1993	Fong et al., 1995	Gillespie et al., 1991	Weber et al., 1994	Berenguer et al., 2003	PML	MS Matthews, 1998
Sintomi								Mediana	
Sensoriali	6	8	7	7	18	4	19	11	50
Crisi epiletiche	6	-	20	14	11	22	13	14	4
Cefalea	7	16	7	-	23	11	-	16	17
Alterazioni della coordinazione dei movimenti degli arti	13	28	40	11	26	11	44	22	47
Deficit della visione	33	24	20	36	30	36	20	36	26
Deficit del linguaggio	17	16	53	7	31	36	47	31	0.8
Mono- emiparesi	33	48	60	46	67	54	70	52	80
Deficit cognitivi	36	24	40	54	66	61	-	45	16

Nelle prime sette colonne sono riportati i sintomi così come osservati in case series retrospettive di PML. L'ultima colonna mostra la frequenza dei sintomi iniziali nella sclerosi multipla (MS). Si osserva una maggiore incidenza di crisi epilettiche e di alterazioni del linguaggio per la PML rispetto alla MS.

3.7 Diagnosi

Fino a qualche tempo fa, la PML non era mai stata considerata come diagnosi differenziale o patologia concomitante rispetto alla sclerosi multipla (MS), ma lo sviluppo inatteso di PML in due pazienti trattati per MS ha reso necessario stabilire criteri e mezzi per identificare la PML in pazienti con MS trattati con natalizumab, un anticorpo monoclonale diretto contro VLA-4, un'integrina $\alpha 4/\beta 1$ [Langer-Gould et al., 2005, Kleinschmidt-De Masters and Tyler, 2005, Yousry et al., 2006]. Attacchi epilettici, disturbi del linguaggio o afasia rappresentano sintomi nuovi e rari in pazienti con MS, con frequenza pari al 2.3%, 4% e 0.8% rispettivamente, e sono suggestivi di PML nel 20-30% dei casi (Tabella 2). Il miglior metodo non invasivo di diagnosi di PML in pazienti immunodepressi è la MRI [Whiteman et al., 1993, Thurnher et al., 1997]. In circa il 90% dei pazienti non sottoposti a una ricostituzione del sistema immunitario, le lesioni non assorbono il gadolinio e non sono occupanti spazio (Figura 2).

Le aree prevalentemente colpite comprendono il lobo frontale paraventricolare e subcorticale e la sostanza bianca del lobo parieto-occipitale, seguite in ordine decrescente da tronco cerebrale, cervelletto, talamo, gangli della base, corpo calloso e, raramente, midollo spinale nella zona cervicale o toracica [Whiteman et al., 1993, Chang et al., 1997]. Segni di una lesione occupante spazio sono stati trovati in circa il 10% dei casi e sono suggestivi di prognosi grave [Post et al., 1999].

Le tecniche diagnostiche Diffusion-weighted imaging (DWI) e Diffusion tensor imaging (DTI) evidenziano aree anomale di diffusione correlate con la progressione della patologia. Con l'uso della spettroscopia protonica a risonanza magnetica (H-MRS), le lesioni mostrano una riduzione del contenuto di N-acetil-aspartato (NAA) e creatina, mentre composti contenenti colina (ES. lipidi di membrana) e lattato sono presenti in concentrazione elevata [Chang et al., 1997, Iranzo et al., 1999].

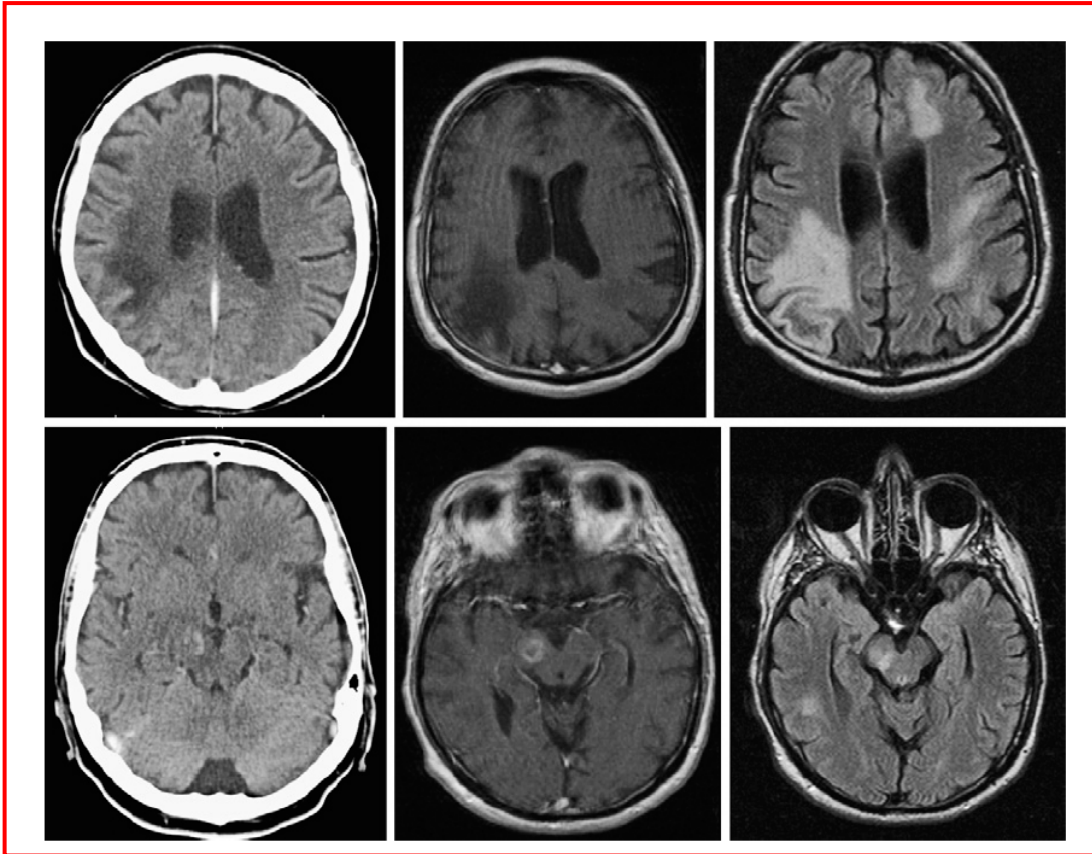


Figura 2: Immagini ottenute per mezzo di TAC e MRI eseguite in un paziente affetto da AIDS e la cui autopsia ha confermato la diagnosi di PML e toxoplasmosi cerebrale. Nell'immagine in alto a sinistra, la TAC mostra piccole lesioni ed evidenzia un'area più piccola rispetto a quanto mostrato dalla MRI. Nella colonna centrale si può osservare l'immagine MRI in modalità T1 che evidenzia una lesione di grandi dimensioni ed ipointensa nella regione destra del lobo occipitale (a livello del giro angolare e del solco intraparietale). A destra invece, l'immagine in modalità T2 rivela la presenza di un interessamento multifocale tipico della PML con ulteriori lesioni della sostanza bianca nella parte sinistra dei lobi frontale, temporale e occipitale. Si nota che le lesioni non colpiscono la materia grigia. Nella fila in basso, la TAC mostra un aumento del contrasto nel peduncolo cerebrale destro, analogamente a quanto ottenuto con il gadolinio nella colonna centrale. Queste lesioni caratterizzate da aumento del contrasto corrispondono alla toxoplasmosi cerebrale evidenziata in fase di autopsia. Nell'immagine in modalità T2 di destra, una ulteriore lesione iperintensa causata dalla PML può essere evidenziata nella sostanza bianca nella regione posteriore destra del giro.

La sensibilità della H-MRS è elevata, ma la sua specificità bassa, per cui il valore predittivo di un risultato positivo è insufficiente per differenziare la PML da lesioni di altra natura, quali le aree demielinizzate nella MS, nei gliomi, nei linfomi, o negli ascessi cerebrali [Simone et al., 1998]. La descrizione dettagliata delle varie caratteristiche di imaging della PML e la loro differenziazione da quelle ascrivibili a nuove lesioni della MS riportate da Yousry e colleghi [Yousry et al., 2006] possono essere riassunte come segue:

- a) le nuove lesioni dovute alla PML sono principalmente diffuse e subcorticali, mentre nella MS le lesioni sono focali e localizzate nella sostanza bianca;
- b) i margini delle lesioni nella PML sono poco definiti e con forma irregolare, mentre nella MS i margini sono netti, talvolta digitiformi (Dawson finger) (Figura 3);

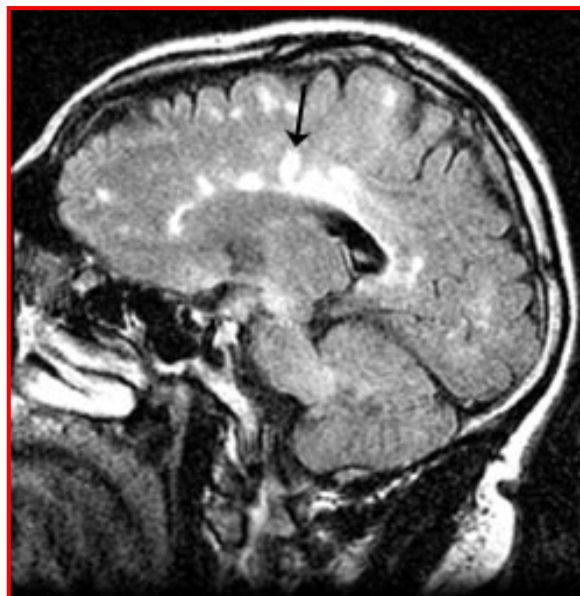


Figura 3: MRI in paziente con MS nella quale si evidenziano le tipiche lesioni digitiformi (Dawson finger)

- c) nella PML le lesioni crescono asimmetricamente e in modo diffuso, sono confinate alla sostanza bianca e non colpiscono la corteccia, mentre nella MS le lesioni sono focali, si ingrandiscono nell'arco di giorni o settimane e decrescono in tempi più prolungati; d) nell'immagine in modalità T2, le lesioni acute della MS mostrano un'area centrale molto marcata (iperintensa) circondata da un anello meno evidente (isointenso) con una leggera

iperintensità al di fuori dell'anello mentre la lesione cronica è iperintensa senza strutture anulari; nella PML le lesioni acute tendono invece ad apparire diffusamente iperintense e possono mostrare solo un'intensità da lieve a moderata nelle aree di recente formazione; e) nelle immagini in modalità T1 contrastate con gadolinio, le lesioni acute della MS risaltano in maniera omogenea e presentano margini ben definiti, mentre le lesioni subacute mostrano una maggiore evidenza della struttura anulare. Fino a qualche anno fa, si sarebbe potuto ragionevolmente argomentare che le lesioni della PML non risultano generalmente evidenziate. Tuttavia in pazienti trattati con HAART per diagnosi recente di AIDS è talvolta possibile osservare un potenziamento periferico o anche denso (Figura 4) [Yousry et al., 2006].

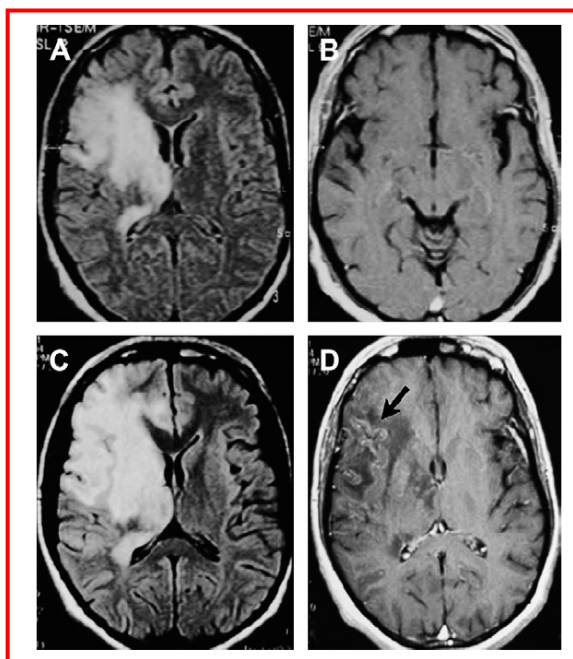


Figura 4: PML infiammatoria. Lesioni demielinizzate estese nel lobo fronto-parietale destro rivelate dall'imaging FLAIR (A), ma non captanti gadolinio come si osserva nell'immagine in modalità T1 (B). Lesione allargata dopo 5 settimane di trattamento con HAART rivelate dall'imaging FLAIR (C), con lesioni captanti gadolinio puntiformi (freccia) (D).

L'introduzione in terapia di natalizumab e lo sviluppo inatteso della PML in 3 pazienti (2 con MS o 1 con morbo di Crohn) trattati con questo anticorpo monoclonale ha stimolato l'analisi retrospettiva di una popolazione ampia di pazienti esposti, che ha suggerito un rischio di PML pari a circa 1 caso su 1000 pazienti trattati per 18 mesi [Yousry et al., 2006]. In due dei tre pazienti con PML associata a natalizumab descritti inizialmente per i

quali erano disponibili i campioni di fluido cerebrospinale (CSF), è stato evidenziato il DNA del JCV. Questa osservazione non è stata riscontrata in 34 pazienti della stessa coorte, valutati retrospettivamente, che erano stati trattati con natalizumab e avevano manifestato sintomi suggestivi di PML [Yousry et al., 2006]. I meccanismi tramite i quali natalizumab potrebbe determinare l'insorgenza di PML sono molteplici [Stuve et al., 1998, Niino et al., 2006]. Natalizumab causa una deplezione durevole dei linfociti, sia CD4 che CD8-positivi nel fluido cerebrospinale. Inoltre, la capacità delle cellule bianche del sangue di migrare appare ridotta, mentre il profilo di espressione delle diverse cellule del sistema immunitario è regolato in modo diverso, con profili unici per ciascun paziente, e la soglia di attivazione delle cellule immunitarie è attenuata. La viremia, o più precisamente, la rilevazione del DNA di JCV nel plasma, si verifica in circa l'1.3% degli individui sani e può aumentare fino al 10-15% negli individui HIV-positivi, mentre raggiunge il 33-50% dei pazienti HIV-positivi con PML [Dubois et al., 1998, Weber, 2001]. In base ad esperienze molto limitate, relative a due pazienti con PML trattati con natalizumab, la viremia di JCV può precedere o coincidere con l'insorgenza dei sintomi e dei segni della PML [Sandborn et al., 2005; Langer-Gould and Steinman, 2006]. I dati ottenuti in studi su pazienti affetti da HIV suggeriscono al massimo una possibilità del 50% di diagnosticare PML attraverso misurazioni in serie della carica virale di JCV nel plasma [Dubois et al., 1998, Weber, 2001]. Questa bassa probabilità di evidenziare nel plasma la carica virale del virus JC ha comportato il fatto che, per più di una decade, l'analisi del CSF con la PCR abbia rappresentato il metodo di scelta per la diagnosi non- o minimamente invasiva di PML [Dubois et al., 1998, Weber, 2001, Moret et al., 2006-Cinque et al., 1993]. L'analisi del CSF evidenzia una pleiocitosi solo nel 14% dei casi, mentre la sintesi intratecale di IgG è stata riscontrata nel 29% dei pazienti [Weber et al., 1997]. Nei pazienti non affetti da AIDS, la PCR per JCV presenta una sensibilità dell'80% e una specificità del 95% nella diagnosi di PML [Weber, 1999]. Tuttavia evidenze più recenti suggeriscono una sensibilità

inferiore, in un intervallo compreso tra 58% e 81% nei pazienti sottoposti ad HAART, determinando una riduzione del valore predittivo negativo dell'89% [Bossolasco et al., 2005, Marzocchetti et al., 2005]. Livelli simili di sensibilità (78%) e di specificità (96.8%) possono essere ottenute dalla ricerca della presenza di anticorpi IgG sintetizzati a livello intratecale e rivolti contro la proteina VP1 di JCV [Weber et al., 1997, Guillaume et al., 2000]. Inoltre nel corso del tempo la percentuale dei pazienti positivi alle IgG prodotte anti-VP1 è andata aumentando, rendendo questi saggi immunoenzimatici una metodologia più affidabile per confermare la diagnosi di PML, anche nei casi in cui con la PCR non sia possibile evidenziare livelli rilevanti di JCV dopo l'eradicazione del virus dal SNC [Giudici et al., 2000].

3.8 Terapia

Il primo farmaco al quale inizialmente era stato attribuito un potenziale terapeutico nella PML è stato citarabina o ARA C. Studi clinici successivi non hanno tuttavia confermato la sua efficacia [Hall et al., 1998, Bauer et al., 1973]. Anche l'uso di interferone alfa-2a non ha mostrato di essere efficace in pazienti con PML in studi clinici pilota [Berger et al., 1992, Weck et al., 1988]. Queste evidenze contrastano con quelle ottenute in alcuni case reports e in un'analisi retrospettiva, ma nel complesso i risultati disponibili orientano verso l'assenza di effetti dell'interferone alfa-2a nel decorso della PML [Huang et al., 1998, Greschwind et al., 2001-Re et al., 1999]. Evidenze aneddotiche suggeriscono una risposta favorevole della PML al trattamento con interleuchina-2 (IL-2). Tuttavia non sono disponibili dati clinici sufficienti a sostegno di queste conclusioni [Jaeckle et al., 1997, Kunschner and Scott, 2005].

Risultati preliminari ottenuti in vitro avevano suggerito un effetto antivirale di cidofovir [Andrei et al., 1997]. Prove di efficacia scarse, o analisi retrospettive ottenute da case reports suggeriscono una risposta almeno parziale della PML a cidofovir ed una

sopravvivenza prolungata associata al trattamento con questo farmaco antivirale [De Luca et al., 2001, Antinori et al., 2003, Blick et al., 1998-De Luca et al., 1999]. Al contrario, un'analisi retrospettiva più ampia, condotta su 35 casi di PML, ha mostrato una sopravvivenza media inferiore associata al trattamento con HAART e cidofovir rispetto ai casi trattati con solo HAART [Wyen et al., 2004]. Uno studio prospettico di fase 1 in 17 pazienti HIV-positivi con PML non ha mostrato alcun effetto di cidofovir nel prolungare la sopravvivenza [Marra et al., 2002]. In un secondo studio prospettico su 24 pazienti è stato osservato che la sopravvivenza non era associata alle diverse modalità di trattamento, cioè, HAART contro HAART + cidofovir, ma con livelli plasmatici di RNA di HIV-1 ≤ 500 copie/ml, e alla conta delle cellule T CD4+ [Marra et al., 2002]. Dati simili sono stati ottenuti in uno studio osservazionale monocentrico condotto su 46 pazienti, che ha confrontato 22 pazienti trattati solo con HAART e 24 pazienti con HAART e cidofovir [Gasnault et al., 2001]. Nel complesso, i dati attualmente disponibili suggeriscono un'associazione tra sopravvivenza prolungata e parametri immunologici (conta delle cellule CD4+) e virologici (livelli plasmatici dell'RNA di HIV-1, carica virale di JC) piuttosto che con le modalità di trattamento. Pochi case report di efficacia del trattamento con cidofovir in pazienti affetti da PML con tumori ematologici [Viallard et al., 2005] o l'assenza di qualsiasi efficacia [Houston et al., 2001, Terrier et al., 2007] sostengono fermamente un bias osservazionale (sovra segnalazione di risultati positivi e sotto-segnalazione di quelli negativi) quale causa del presunto effetto benefico di cidofovir nella PML. Dati ottenuti con camptotecina, un inibitore della topoisomerasi I, hanno dimostrato che questo farmaco è scarsamente efficace nell'inibire la replicazione di JCV in modelli di coltura cellulare [Kerr et al., 1993]. Un case report suggerisce un prolungamento della sopravvivenza in un paziente con lupus eritematoso sistemico controllato con steroidi e trattato con camptotecina [Vollmer-Haase et al., 1997]. Una serie di nove pazienti trattati con topotecano sembrava mostrare un modesto beneficio, benché associato ad una grave

tossicità ematologica [Royal et al., 2003]. Anche per cidofovir e camptotecina, in un bilancio delle evidenze disponibili, non si rilevano prove di efficacia sufficienti.

La comprensione del meccanismo di tras migrazione del JCV virus attraverso la BBB è essenziale per lo sviluppo di strategie terapeutiche che limitano l'entrata del JCV nel cervello, prevenendo l'entrata di JCV nel sistema nervoso centrale. Un recente studio ha dimostrato che il poliomavirus chimerico JC utilizza il recettore 5HT_{2A} per infettare le cellule SVG-A, un sub-clone di cellule umane gliali fetali (Elphick et al 2004). Altschuler and Kast (2005) hanno suggerito che farmaci antipsicotici quali risperidone, ziprasidone e olanzapina con un'attività antagonista del recettore 5HT_{2A} significativamente più potente possono essere utili nel trattamento o nella prevenzione della PML. Dato che metà della popolazione sana adulta elimina grandi quantità di JCV nelle urine (Agostini et al, 2001; Agostini et al, 1997; Agostini et al, 1996; Shah et al, 1997) questo fornisce un'opportunità unica per valutare la sicurezza e la tollerabilità di farmaci quali risperidone e mirtazapina per l'attività anti-JCV, utilizzando la clearance urinaria di JCV come marker surrogato di efficacia nella PML (Focosi et al, 2007b). Alcuni case reports hanno suggerito un beneficio sulla sopravvivenza in pazienti con PML, HIV-negativi, trattati con risperidone (Focosi et al, 2007) o mitrazepam (Owczarczyk et al, 2007; Verma et al, 2007; Vulliemoz et al, 2006), dimostrando l'eliminazione di JCV dal sangue (Focosi et al, 2007). E' possibile che i bloccanti del recettore 5HT_{2A} siano efficaci nel controllo della replicazione JCV in vivo. Comunque, non è chiaro se l'effetto benefico osservato in questi pazienti sia il risultato di una variazione del trattamento immunosoppressore che ha portato a ricostituzione immune o sia dato dal contributo dei bloccanti del recettore 5HT_{2A} quali risperidone o mirtazapina. Uno studio successivo ha dimostrato che cellule umane endoteliali cerebrali microvascolari possono essere infettate con JCV indipendentemente dal recettore 5HT_{2A} (Chapagain et al, 2007). Per valutare la capacità di un antagonista del recettore 5HT_{2A}, risperidone, per inibire l'infezione JCV, Moti e coll (2008), hanno trattato primariamente cellule gliali

fetali umane *in-vitro* con risperidone per 24 h e inoculate con JCV. Non è stata osservata una significativa differenza nelle copie del genoma JCV o nei trascritti di mRNA e l'espressione della proteina nel trattamento nivee nelle cellule *primary human fetal glials* (PHFG) trattate con risperidone. Questi dati indicano che risperidone non inibisce l'attacco, l'internalizzazione e la replicazione di JCV nelle cellule PHFG e i bloccanti del recettore 5HT_{2A} possono risultare inefficaci nel trattamento della PML.

In conclusione, la terapia ideale della PML in pazienti con AIDS è una terapia antiretrovirale, che diminuisce significativamente la carica virale di HIV-1 RNA nel plasma e possibilmente nel liquido cerebrospinale (CSF), oltre ad un miglioramento della funzione immunitaria cellulare [Berenguer et al., 2003, De Luca et al., 2001, Antinori et al., 2003, De Luca et al., 2000, Giudici et al., 2000, Yiannoutsos et al., 1999].

3.9 Prognosi

Una conta dei CD4 di 100/mm³ o più elevata, una carica virale bassa di JC nel CSF pari a 100 copie/μl o inferiore, e la presenza di cellule T citotossiche specifiche per JCV in pazienti HLA-A2+ e HIV-1 positivi sono associati ad un prolungamento della sopravvivenza [Koralnik et al., 1999, Koralnik et al., 2002, Yiannoutsos et al., 1999, Taoufik et al., 1998, Garcia De Viedma et al., 2002]. Più del 10% dei pazienti con PML e nuovamente trattato con HAART per l'HIV sviluppa una sindrome infiammatoria da ricostituzione immunitaria (IRIS) [Venkataramana et al., 2006, Safdar et al., 2002, Martinez et al., 2006]. Questa sindrome è caratterizzata da un rapido deterioramento clinico insieme ad una massiva reazione infiammatoria nel parenchima cerebrale [Berenguer et al., 2003, Miralles et al., 2001]. Valutazioni che hanno impiegato immunocolorazioni del tessuto cerebrale hanno mostrato un numero di infiltrazioni di cellule T CD3+ significativamente aumentato e di CD8+ nelle lesioni captanti il gadolinio rispetto alle non captanti [Huang et al., 2007].

4. RITUXIMAB E LEUCOENCEFALOPATIA MULTIFOCALE PROGRESSIVA

Il trattamento con rituximab è stato associato ad infezioni virali come complicanza del trattamento. Nel febbraio 2006, dopo 9 anni dall'approvazione della Food and Drug Administration (FDA) per l'uso clinico, nel foglietto illustrativo di rituximab sono state introdotte nuove informazioni riguardanti pazienti affetti da linfoma non-Hodgkin (LNH) che hanno sviluppato gravi infezioni virali in seguito al trattamento con questo farmaco. Le infezioni comprendono epatite B, infezioni da citomegalovirus, infezioni da virus herpes simplex, varicella zoster, virus West Nile e virus JC [Aksoy et al., 2007]. Nel 2006 e nel 2007, la FDA, la European Medicines Agency, la World Health Organization e l'azienda produttrice hanno divulgato avvisi di allerta sulla sicurezza del farmaco riportando il caso di due pazienti affetti da lupus eritematoso sistemico (LES) che hanno sviluppato PML in seguito a trattamento con rituximab e con un altro farmaco immunosoppressore [FDA, 2009; EMEA, 2009; WHO, 2009; Genentech, 2006]. Nel settembre 2008, la FDA e l'azienda produttrice di rituximab hanno divulgato alcune "Dear Health Care Professional Letter" descrivendo il caso di un terzo paziente affetto da artrite reumatoide che è deceduto a causa di PML 18 mesi dopo essere stato sottoposto a trattamento con rituximab, corticosteroidi e metotrexato [Genentech, 2008; Genentech and Biogen, 2009].

Uno studio condotto da Carson e coll. (2009) ha pubblicato una revisione dei casi di PML associati a rituximab documentabili attraverso la letteratura e la consultazione di banche dati. Sono stati descritti 57 casi di pazienti HIV-negativi che hanno sviluppato PML in seguito al trattamento con rituximab nell'ambito del progetto "Research on Adverse Drug Events and Reports" (RADAR). Il progetto RADAR è costituito da un team multidisciplinare sostenuto dall'NIH, focalizzato sull'identificazione, la valutazione e la divulgazione di informazioni che descrivono eventi avversi rari e potenzialmente fatali. I casi di PML sono stati individuati in pazienti trattati con rituximab dai clinici di 12 centri

oncologici o ospedali universitari di Stati Uniti, Italia e Australia (22 casi), attraverso una revisione dei casi segnalati all'FDA (11 casi), utilizzando il database dell'azienda produttrice (30 casi) e tramite pubblicazioni (18 casi). Il periodo di ricerca era compreso tra la prima data di approvazione di rituximab da parte dell'FDA (1997) al 31 dicembre 2008. Eventuali casi duplicati sono stati identificati in base all'età, al sesso e alla patologia. I criteri di inclusione comprendevano: terapia con rituximab precedente alla diagnosi di PML o ai suoi sintomi; conferma della diagnosi di PML sulla base dell'esame istologico del tessuto cerebrale o tramite risonanza magnetica che mostrasse lesioni compatibili con un processo di demielinizzazione; rilevazione di DNA del JCV nel liquido cerebrospinale (CSF) con tecnica PCR; nessuna evidenza di infezione da HIV.

L'età mediana dei 57 pazienti descritti era di 61 anni (range 30-89 anni). La diagnosi primaria comprendeva: disturbo linfoproliferativo delle cellule B (52 pazienti), lupus eritematoso sistemico (2 pazienti), artrite reumatoide (1 paziente), pancitopenia autoimmune (1 paziente) e porpora trombocitopenica immune (1 paziente). Due pazienti con patologia linfoproliferativa delle cellule B avevano sviluppato anemia emolitica autoimmune. Sette pazienti affetti da malattia linfoproliferativa erano stati sottoposti a trapianto ematopoietico di cellule staminali (tre allogenico e quattro autotrapianto). Tra questi sette pazienti, uno aveva ricevuto la terapia con un analogo purinico e tutti erano stati trattati sia con farmaci alchilanti che con corticosteroidi. Un paziente aveva sviluppato una malattia linfoproliferativa dopo il trapianto renale.

I 49 pazienti con PML, non sottoposti a trapianto in precedenza, erano stati trattati con analoghi purinici (46%), agenti alchilanti (81%) e corticosteroidi (75%). Un paziente affetto da LNH con anemia emolitica autoimmune aveva assunto in precedenza soltanto corticosteroidi e rituximab, un paziente con pancitopenia idiopatica autoimmune era stato trattato con corticosteroidi, azatioprina, e rituximab e un paziente affetto da porpora trombocitopenica immune aveva ricevuto corticosteroidi, danazolo, immunoglobuline per

via endovenosa, azatioprina e romiplostim. Le terapie effettuate in precedenza per i due pazienti con lupus eritematoso sistemico comprendevano corticosteroidi e farmaci antineoplastici mentre per il paziente con artrite reumatoide la terapia comprendeva corticosteroidi, metotressato, un chemioterapico contenente platino e un inibitore del TNF- α . La diagnosi di PML era preceduta da una mediana di sei dosi di rituximab (range 1-28 dosi). Il periodo di tempo mediano dalla prima somministrazione di rituximab alla diagnosi di PML era 16 mesi (range 1-90 mesi) mentre dall'ultima somministrazione di rituximab alla diagnosi di PML era di 5.5 mesi (range 0.3-66 mesi).

I sintomi iniziali della PML comprendevano confusione/disorientamento (54% dei pazienti), emiparesi/debolezza motoria (33%), perdita di coordinazione motoria (25%), disturbi del linguaggio (21%) o della visione (18%). La diagnosi è stata confermata tramite risonanza magnetica e rilevamento del JCV nel CSF (54%) e dalla biopsia o autopsia nei rimanenti casi. Studi quantitativi su cellule T, disponibili per 14 pazienti, hanno identificato linfopenia CD4 (conta linfocitica CD4+ minore di 500 cellule/ μ L) (9 pazienti) o rapporto CD4/CD8 diminuito (9 pazienti). Il periodo mediano fra l'ultima dose di rituximab e la diagnosi di PML era minore nei pazienti che avevano una conta linfocitica CD4+ <500 cellule/ μ L rispetto a quelli con valori superiori (3 vs 17 mesi). Un paziente trattato con rituximab che non aveva ricevuto in precedenza un trapianto ematopoietico di cellule staminali, analoghi purinici o farmaci alchilanti aveva una conta cellulare CD4+ e un rapporto CD4/CD8 normale. Campioni di midollo osseo fissati in paraffina ottenuti da tre pazienti precedentemente trattati con rituximab presentavano JCV rilevabile tramite PCR. L'incidenza dei casi fatali è stata del 90%; 100% fra i casi di PML diagnosticati entro tre mesi dall'ultima dose di rituximab contro l'84% dei casi di PML diagnosticati più di tre mesi dopo l'ultima dose di rituximab. I trattamenti per la PML comprendevano citarabina, terapie antivirali o immunologiche. Dei cinque pazienti non deceduti, due non ricevevano terapia, uno assumeva citarabina, un altro mirtazapina e l'ultimo era trattato

con cidofovir, infusioni di linfociti, citarabina e risperidone. Questi pazienti presentavano postumi quali deficit neuronale con afasia motoria, emiparesi e disturbi visivi.

Questo studio rappresenta il primo 'case series' di PML sviluppata in pazienti HIV-negativi trattati con rituximab. Non è stato finora possibile stimare con precisione l'incidenza di questa reazione avversa in soggetti affetti da linfoma per la sottosegnalazione dei casi di PML in pazienti trattati con rituximab e per la mancanza di informazioni sul numero effettivo dei pazienti con linfoma trattati con questo farmaco. E' verosimile che la somministrazione di rituximab aumenti il rischio di insorgenza di PML, sebbene il rischio assoluto sia probabilmente basso.

PARTE SPERIMENTALE

5. OBIETTIVI

Questa tesi si pone i seguenti obiettivi:

- 1) Descrivere i casi di PML osservati presso l'Unità Operativa (UO) di Ematologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana (AOUP) in pazienti affetti da linfoma non-Hodgkin esposti a trattamento con rituximab.
- 2) Valutare l'incidenza di PML in pazienti affetti da linfoma non-Hodgkin esposti a rituximab attraverso l'analisi del database dell'UO di Ematologia dell'AOUP.
- 3) Confrontare l'incidenza di PML nei pazienti affetti da linfoma non-Hodgkin esposti a rituximab in cura presso l'UO di Ematologia dell'AOUP con l'incidenza di PML descritta in letteratura per altre popolazioni di pazienti.
- 3) Valutare il rischio di PML in pazienti affetti da linfoma non-Hodgkin esposti a rituximab rispetto ai non esposti attraverso l'analisi del database dell'UO di Ematologia dell'AOUP.

6. METODI

Nella prima fase della ricerca sono stati valutati retrospettivamente i registri informatizzati dell'UO di Ematologia dell'AOUP, contenenti dati demografici e clinici di tutti i pazienti ricoverati dal 1994 ($n = 12.291$). Di ciascun paziente sono state recuperate le seguenti informazioni: età, sesso, motivo di accesso alle cure, diagnosi di patologie ematologiche, data della diagnosi delle patologie reumatologiche, trattamenti farmacologici, eventi avversi, necessità di consulenze specialistiche neurologiche. Sono stati analizzati i dati disponibili fino ad ottobre 2008 alla ricerca di possibili casi di PML. Di tutti i casi sospetti sono state recuperate le cartelle cliniche complete per verificare la diagnosi. Le informazioni contenute nelle cartelle hanno permesso la descrizione dei casi confermati.

Nella seconda fase della ricerca sono stati selezionati tutti i pazienti affetti da linfoma non-Hodgkin esposti a trattamento con rituximab in monoterapia o nel contesto di protocolli di trattamento multipli. Sono stati esclusi dall'analisi pazienti HIV-positivi. All'interno di questa popolazione sono stati individuati i casi di PML con diagnosi documentata da risonanza magnetica (RM) e positività al virus JC alla biopsia cerebrale stereotattiche e/o positività JCV nel fluido cerebrospinale, i cui sintomi fossero insorti almeno un mese dopo la prima dose di rituximab somministrata. Per questi pazienti è stato calcolato l'*incidence rate* di PML in base al periodo di esposizione a rituximab calcolato all'ultimo follow up disponibile. Inoltre, abbiamo esaminato la letteratura inglese utilizzando PubMed e EMBASE senza limiti di tempo, per gli studi che hanno valutato l'incidenza di PML in popolazioni differenti per confrontare i nostri dati con le osservazioni precedenti. Sono stati selezionati solo gli studi che hanno riportato l'*incidence rate* o dati nei quali l'*incidence rate* poteva essere stimata.

Nella terza fase della tesi è stato valutato il rischio di PML in pazienti affetti da NHL, HIV-negativi esposti a regime chemioterapico standard con o senza rituximab, per determinare se l'uso di rituximab abbia aumentato l'incidenza di PML. I pazienti sono stati

inclusi nell'analisi se al momento della diagnosi di NHL, risultavano negativi al test HIV durante il periodo di follow-up e se erano seguiti per almeno 6 mesi. Il periodo di follow-up è stato definito come l'intervallo di tempo tra la diagnosi di NHL e l'insorgenza di PML, il decesso o almeno una visita registrata. Per ogni paziente sono stati registrati il sesso, l'età, il tipo di NHL, lo stadio alla diagnosi e la richiesta di procedure neurologiche (almeno una TAC cerebrale, una MR o una visita neurologica) durante il follow-up. I linfomi non-Hodgkin sono stati raggruppati in base allo stadio come patologie in fase precoce (stadio Ann Arbor I o II) o avanzata (stadi Ann Arbor III e IV) [Carbone P et al., 1971] e come basso o alto grado secondo la classificazione WHO [Swerdlow S et al., 2008]. I casi di PML sono stati inclusi solo quando la diagnosi era sostenuta almeno dalla MR, secondo linee guida riconosciute (Cinque P et al., 2003). L'esposizione a rituximab è stata definita da almeno una dose di rituximab ricevuta durante il periodo di follow-up. Il rischio di PML è stato calcolato come *risk difference* (RD) fra i pazienti esposti a rituximab e i non-esposti piuttosto che *risk ratio*, dato che quest'ultimo può essere molto elevato quando il numeratore si avvicina a zero (nelle patologie rare come la PML) [Oberlander T et al., 2008; Davies H et al., 1998; Kraemer H et al., 2003]. Gli intervalli di confidenza per l'incidenza e l'RD sono stati calcolati utilizzando il metodo proposto da Armitage [Armitage et al., 2002]. Il RD aggiustato è stato calcolato tramite standardizzazione diretta. La somma degli anni-paziente calcolata nei due gruppi (esposti e non esposti a rituximab) è stata utilizzata come popolazione standard. La stratificazione è stata effettuata usando i quartili di propensity score calcolati con regressione logistica multipla, usando come covariate quelle variabili (età e sesso) che mostravano una differenza statisticamente significativa ($p < 0.05$) all'analisi univariata. I valori medi sono stati confrontati dal t-test di Student, mentre i valori proporzionali sono stati confrontati dal test del χ^2 . Per l'analisi statistica abbiamo utilizzato il software SPSS, versione 14 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

7. RISULTATI

7.1. PML NEI PAZIENTI TRATTATI CON RITUXIMAB PRESSO L'UNITA' OPERATIVA DI EMATOLOGIA DELL'AZIENDA OSPEDALIERA UNIVERSITARIA PISANA

L'Unità Operativa di Ematologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana ha contribuito ai case series disponibili sulla PML con 6 casi (5 in pazienti NHL, 1 in paziente con anemia emolitica autoimmune riportati di seguito in Tab.4) (Pelosini et al., 2007; Tuccori et al., 2009A). La tabella 4 mostra le principali caratteristiche di questi casi e la tabella 5 mostra in dettaglio i protocolli di trattamento.

Tab. 4: Casi di PML in pazienti NHL osservati presso l'Ematologia di Pisa					
Caratteristiche	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4	Caso 5
Età/sexo (Anno di insorgenza di PML)	66/maschio (2004)	76/maschio (2004)	60/maschio (2005)	45/maschio (2008)	68/maschio (2008)
Tipo di linfoma (anno di diagnosi)	NHL (2004)	NHL (2004)	NHL (2002)	NHL (2000)	NHL (2002)
Rituximab esposizioni (regimi)	R-CHOP	R-PVMyBEC Mantenimento	R-DHAP Mantenimento	R-hyperCVAD R-DHAP Mantenimento	R-CVP Mantenimento
Esposizione a farmaci per i quali esiste evidenza di una possibile associazione con PML	Ciclofosfamide Prednisone	Ciclofosfamide Prednisone	Ciclofosfamide Desametasone Prednisone	Ciclofosfamide Ciclosporina Metotressato Desametasone	Ciclofosfamide Cladribina Prednisone
Altri trattamenti	Doxorubicina Vincristina Etoposide Bleomicina	Cisplatino Idarubicina Epirubicina Etoposide Vinblastina Bleomicina	Cisplatino Catarabina Doxorubicina Vincristina	Mitoxantrone Melfalan Carmustina Etoposide Citarabina Vincristina Doxorubicina Cisplatino Allogeneico	Bendamustina Lenalidomide Vincristina Doxorubicina
Trapianto di cellule staminali	-	-	-	-	-

Tab.5: Dettaglio dei protocolli di trattamento	
Acronimi	Farmaci e cicli
R-hyperCVAD	Rituximab 375 mg/m ² e.v., ciclofosfamide 300 mg/m ² e.v., doxorubicina 50 mg/m ² e.v., vincristina 2 mg e.v., desametasone 40 mg e.v. o per os, G-CSF 10 µg/kg, metotrexato 200 mg/m ² e.v.
R-DHAP	Rituximab 375 mg/m ² e.v. al giorno 1, cisplatino 100 mg/m ² e.v. al giorno 2, citosina arabinoside 2 g/m ² 2/die e.v. al giorno 3, desametasone 40 mg e.v. al giorno 2 di 5
R-CVP	Rituximab 375 mg/m ² e.v., ciclofosfamide 400 mg/m ² e.v. al giorno 1 di 5, vincristine 1.4 mg/m ² e.v. al giorno 1, prednisone 100 mg/m ² per os, al giorno 1 di 5;
BEAM	Carmustina 300 mg/m ² e.v. al giorno 6; etoposide 200 mg/m ² e.v., seguita da citarabina 200 mg/m ² e.v. 2/die, da 5 giorni prima dell'inizio fino a 2; melphalan 140 mg/m ² e.v., 1 giorno prima dell'inizio
COMP	Ciclofosfamide 750 mg/m ² e.v. al giorno 1, doxorubicina 50 mg/m ² , vincristina 2 mg, prednisone 100 mg per os, al giorno 1 di 5
R-CHOP	Ciclofosfamide 750 mg/m ² e.v. al giorno 1, doxorubicina 50 mg/m ² e.v. al giorno 1, vincristina 1.4 mg/m ² al giorno 1, prednisone 100 mg per os, al giorno 1 di 5
P-VMYBEC	Prednisone 50 mg, per os; doxorubicina liposomiale 30 mg/m ² e.v. bolo; etoposide 100 mg/m ² e.v. ai giorni 1, 15, 29, 43; ciclofosfamide 350 mg/m ² e.v. ai giorni 1,14, 28, 42; vincristina 2 mg e.v. bolo and bleomicina 5 mg/m ² e.v. bolo ai giorni 7, 21, 35.

7.1.1 Caso 1: Un paziente di sesso maschile di 66 anni con linfoma a cellule mantellari ha ricevuto 2 di 4 dosi previste di rituximab (375 mg/m²) all'interno del ciclo CHOP (Gennaio-Febbraio 2004). A causa dell'insorgenza di reazioni da infusione (febbre, brividi, dolore lombare) le ultime 2 dosi non sono state somministrate. Poichè la risposta ottenuta è risultata parziale, il paziente ha ricevuto successivamente 8 cicli di P-VMYBEC (Settembre-Ottobre 2004). A dicembre 2004, il paziente ha sviluppato paraplegia. L'RMI cerebrale e la tomografia computerizzata (CT) hanno mostrato aree multiple di demielinizzazione subcorticale. Nonostante il test JCV DNA in CSF fosse risultato negativo, poiché questo test è poco sensibile nei pazienti HIV-negativi (Weber et al., 1997), viene diagnosticata una probabile PML (Cinque et al., 2003). Il paziente è deceduto nel Dicembre 2004 prima che fosse possibile realizzare una biopsia stereotassica cerebrale. Non è stato eseguito esame autoptico.

7.1.2 Caso 2: Ad un uomo di 76 anni viene diagnosticato nel novembre 2004 un linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL), stadio Ann Arbor III, associato ad anemia emolitica autoimmune, inizialmente trattata con 1 ciclo di rituximab 650 mg/settimana e mantenimento con prednisone 100 mg/die per 7 mesi. Il paziente viene poi trattato con R-PVABEC e idarubicina, cisplatino e prednisone ottenendo una risposta completa. Dopo 4 mesi il paziente sviluppa dismnesia e disturbi visivi per i quali viene ricoverato presso il reparto di neurologia. La MRI mostra una lesione localizzata non evidenziata dal mezzo di contrasto nei lobi destro parietale e temporo-occipitale estendendosi verso lo splenio. Le analisi del sangue hanno mostrato ipogammaglobulinemia e linfopenia CD4⁺ T. La PCR sul CSF è risultato negativo per JCV. Pertanto viene condotta una biopsia cerebrale, che consente diagnosi di PML (PCR positiva per JCV). Il paziente viene trattato con cidofovir 300 mg/settimana per due cicli. MRI ha mostrato un effetto massa, coinvolgendo il lobo temporale posteriore destro, i lobi parietale e occipitale e il tubercolo quadrigemino superiore destro. Le condizioni cliniche peggiorano, con insorgenza di emianopsia sinistra e deficit motorio. Il paziente è deceduto dopo pochi giorni dalla diagnosi.

7.1.3 Caso 3: Ad un uomo di 60 anni viene diagnosticato nel 2002 un linfoma follicolare di grado I, stadio Ann Arbor II. Il paziente viene trattato con CHOP, R-DHAP e cicli di chemioterapia aggressiva. In Aprile 2005, per la persistenza del riarrangiamento clonale BCL-2/IGHJ nel midollo spinale, il paziente riceve tre cicli di rituximab secondo lo schema convenzionale (375 mg/m² una volta a settimana per quattro dosi). Prima del quarto e ultimo ciclo, il paziente sviluppa confusione mentale, amnesia, disartria e afasia. L'MRI mostrava lesioni non captanti coerenti con un processo di demielinizzante nel lobo basale posteriore e paracornuale frontale e nel centro semiovale sinistro. La rilevazione del genoma JCV è risultata positiva nel sangue periferico. L'analisi della *polymerase chain reaction* (PCR) del CSF è risultata negativa per JCV DNA. Una biopsia stereotassica ha

confermato la diagnosi di PML. Nonostante il trattamento con cidofovir (300 mg/settimana per due cicli) e terapie di supporto, le condizioni del paziente sono rapidamente peggiorate sia radiologicamente che clinicamente con progressiva afasia, dislessia, confusione, paralisi centrale del nervo facciale destro, incontinenza urinaria e fecale, paralisi flaccida dell'arto superiore destro, ipostenia dell'arto inferiore destro e richiesta di intubazione nasogastrica fino al decesso del paziente nel giugno 2005. Le analisi del sangue periferico hanno mostrato ipogammaglobulinemia e linfopenia CD4⁺ T.

7.1.4 Caso 4: Un paziente di 45 anni affetto da linfoma a cellule mantellari viene trattato con 4 cicli di R-hyperCVAD (Ottobre 2000-Agosto 2001), seguito da mitoxantrone e melfalan e trapianto autologo di cellule staminali emopoietiche (HSCT) (Ottobre 2001). La remissione completa è stata mantenuta con 4 cicli di rituximab 375 mg/m² (Maggio-Giugno 2002). A Novembre 2005, una ricaduta ossea ha richiesto 4 cicli di R-DHAP (terminati a Febbraio 2006) e BEAM-conditioned allogeneic HSCT (Marzo 2006). La profilassi dalla malattia del trapianto contro l'ospite (GVHD) è stata effettuata con metotressato 15 mg/m² on day +1 and 10 mg/m² nei giorni +3, +6 e +11 e ciclosporina A titolata per raggiungere una concentrazione sierica di 200-400 pg/ml fino ad ottobre 2006. Sono stati poi somministrati 5 cicli di mantenimento con rituximab (375 mg/m²) tra Gennaio 2007 e Aprile 2008. Ad Aprile 2008, mentre il paziente era in completa remissione, sviluppa emianopsia bilaterale. La RMI ha mostrato lesioni sottocorticali della materia bianca. Una biopsia cerebrale stereotassica (Giugno 2008) ha rilevato la presenza di JCV DNA tramite PCR e l'istomorfologia ha confermato la PML. Nonostante i trattamenti con mirtazapina 30-45 mg/die per os, cidofovir 5 mg/kg e.v. (4 cicli) e risperidone 4 mg/2 die per os, una seconda RMI (Giugno-Settembre 2008) ha mostrato una progressione delle lesioni demielinizzanti. Il paziente è deceduto per insufficienza respiratoria nel settembre 2008.

7.1.5 Caso 5: Un paziente di 68 anni ha ricevuto 9 cicli di cladribina per e.v per linfoma nella zona marginale splenica (Maggio-Dicembre 2002), ottenendo una remissione completa. A causa della recidiva della patologia, il paziente ha ricevuto 6 cicli di R-CVP (Novembre 2006 - Aprile 2007). In seguito ad una risposta parziale, il paziente viene trattato con 10 cicli di mantenimento con rituximab (375 mg/m^2 ; Giugno-Ottobre 2007). A Novembre 2007, la progressione della patologia ha richiesto un trattamento con bendamustina 90 mg/m^2 per e.v (5 cicli). A Dicembre 2007, il paziente lamenta disturbi visivi e dismnesia, e tramite l'RM sono state rilevate lesioni demielinizzanti indicative di PML (Figura 9a-d). A causa della progressione del linfoma, il paziente inizia il trattamento con lenalidomide 25 mg/die (Maggio-Giugno 2008). L'istomorfologia e la positività JCV alla PCR tramite biopsia cerebrale stereotassica hanno confermato la PML (Giugno 2008). Il paziente viene trattato con mirtazapina 30 mg/die . A Settembre 2008, la RMI al follow-up, ha mostrato nuove aree di demielinizzazione, nonostante un modesto miglioramento nell'area demielinizzata di partenza (Figura 9 e-f). Il paziente riceve così a 4 cicli chemioterapici di COMP per il trattamento della progressione del linfoma. A Dicembre 2008, una nuova valutazione con RM mostra un ulteriore peggioramento della patologia (Figura 9 g-h). Il paziente è deceduto per leucostasi, nel Marzo 2009.

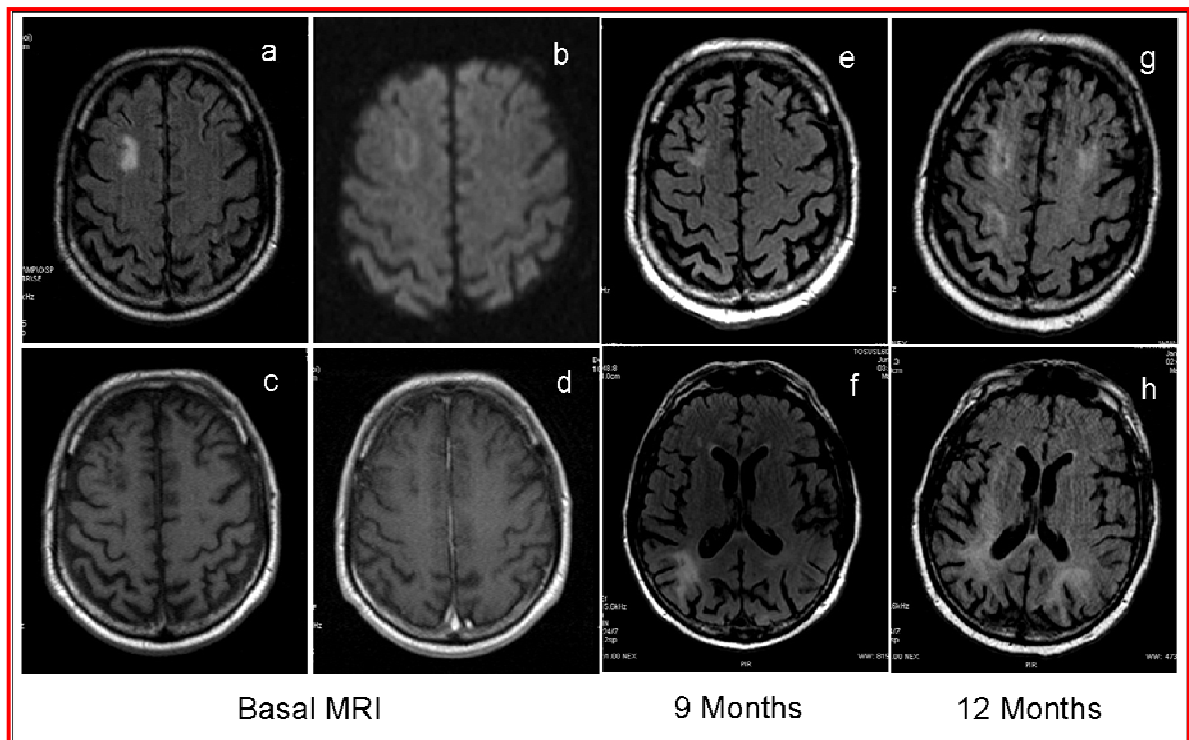


Figure 9: RMI nel caso 5. La prima RM (Dicembre 2007) ha rilevato una lesione frontale sinistra iperintensa omogenea del centro semiovale tramite immagine assiale FLAIR (a) corrispondente ad un'area ipointensa (c) non-captante (d) all'immagine pesata T1. L'immagine DWI (b) della stessa lesione mostra un nucleo centrale di ipointensità delimitato da un segnale ad elevata intensità che suggerisce una lesione demielinizzanti causata probabilmente alla PML. Nove mesi dopo, la lesione sinistra frontale mostrava a una riduzione delle dimensioni con caratteristiche atrofici che coinvolgono il giro dentato (e). Nonostante ciò, lesioni analoghe della materia bianca che coinvolgono anche le fibre sottocorticali "U" con aspetto "scaloped", si sono sviluppate nei lobi temporale sinistro e parietale (f). Le lesioni della materia bianca sono diventate progressivamente multiple e confluenti, coinvolgendo asimmetricamente entrambi gli emisferi cerebrali come mostrato nelle immagini assiali FLAIR ottenute 12 mesi dopo (g-h).

7.2 INCIDENCE RATE DI PML NEI PAZIENTI NHL TRATTATI CON RITUXIMAB E CONFRONTO CON LA LETTERATURA

I criteri di selezione hanno permesso l'individuazione di 821 pazienti HIV-negativi consecutivi esposti ad almeno una dose di rituximab per il trattamento di LNH nel periodo compreso tra Gennaio 2000 e ottobre 2008 follow-up. Tutti i pazienti hanno ricevuto chemioterapia oltre a rituximab, e tutti hanno completato il loro periodo di trattamento presso l'Unità Operativa di Ematologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana. Nessun paziente ha ricevuto terapia radiante. Il tempo mediano di follow-up è stato di 20 mesi (range=1-106 mesi), per un totale di 1725 pazienti-anno a rischio. Cinque pazienti con PML (due ricevevano rituximab come terapia di mantenimento) sono stati identificati con una incidenza di 2.89 casi per 1000 pazienti-anno. La Tabella 6 confronta il dato ottenuto nella nostra popolazione con quello osservato in altre popolazioni, ottenuto dall'analisi della letteratura medica.

Tabella 6: Incidence rate di PML in popolazioni differenti*

Popolazione	Periodo	Paese	Incidence rate	Referenza
Popolazione generale	1984	USA	0.0002 †	Holman et al. (1998)
Popolazione generale	1994	USA	0.0033 †	
Pazienti con leucemia linfocitica cronica B	1987-1991	USA	1.08 ‡	Bower et al. (1997)
Pazienti con linfoma Hodgkin	1970-1984	Paesi Bassi	0.46 §	van Rijswijk et al.
Pazienti HIV +	1995-1996	Danimarca	3.3	Engsig et al.(2008)
Pazienti HIV +	1997-1999	Danimarca	1.8	
Pazienti HIV +	2000-2006	Danimarca	1.3	
Pazienti con trapianto renale trattati con MMF	2000-2004	USA	0.144	Neff et al. (2008)
Pazienti trattati con natalizumab per MS, CD, or RA	2001-2005	Europa, N. America, Australia	<0.64	Yousry et al. (2006)
Pazienti affetti da LNH in terapia con rituximab	2000-2008	Italy	2.89 ¶	Studi

* Nuova diagnosi di PML per 1000 anni-paziente

† Decessi associati a PML per 1000 anni-paziente

‡ n=962; tempo mediano a rischio=57.5 mesi; 5 pazienti con PML

§ n=340; tempo mediano a rischio=76.6 mesi; 1 paziente con PML

|| n=3116; tempo mediano a rischio=17.9 mesi; 3 paziente con PML

¶ n=821; tempo mediano a rischio=20 mesi; 5 paziente con PML

7.3 RISCHIO DI PML NEI PAZIENTI LNH ESPOSTI A RITUXIMAB RISPETTO AI NON ESPOSTI

I criteri di inclusione hanno consentito la selezione di 976 pazienti affetti da LNH. Complessivamente 517 pazienti hanno ricevuto almeno una dose di rituximab (375 mg/m^2) durante il periodo di follow-up. Il numero mediano delle dosi di rituximab somministrato in questo gruppo è stato di 4 (range 1-27). Il numero di pazienti con diagnosi di LNH antecedente al 1998 (anno nel quale rituximab è stato approvato dall'Agenzia Regolatoria Italiana) è stato di 32 (6.2%) e 195 (42.5%) per esposti vs non-esposti, rispettivamente. La tabella 7 riassume le principali caratteristiche delle due popolazioni.

Tabella 7: Caratteristiche delle due popolazioni			
Parametri	Esposti a rituximab (n = 517)	Non-esposti a rituximab (n = 459)	Valore P
Età media (anni) \pm SD	58.3 \pm 14.1	61.5 \pm 14.0	< 0.001
Media FU (years) \pm SD	4.0 \pm 3.1	4.7 \pm 3.4	0.002
Maschi n (%)	285 (55.1)	206 (44.9)	0.002
Procedure diagnostiche n* (%)	38 (7.4%)	35 (7.6)	0.903
Grado [§] (aggressivo)	238 (46.0)	222 (48.4)	0.480
Stadio [†] (avanzato)	76 (14.8)	82 (17.9)	0.397
PML	5	0	-

*Pazienti che sono stati sottoposti almeno ad una procedura fra CT-scan, MRI o visita neurologica

[§]Grado basso o aggressivo (classificazione WHO)

[†]Malattia precoce (Ann Arbor stadio I o II) o avanzata (Ann Arbor stadio III o IV)

PML: leucoencefalopatia multifocale progressiva; **FU**: follow-up; **MRI**: risonanza magnetica; **CT**: tomografia computerizzata; **WHO**: World Health Organization

Non sono stati osservati casi di PML nella popolazione dei non esposti a rituximab. Quattro dei cinque casi di PML nel gruppo esposti a rituximab sono stati confermati dal rilevamento di JCV DNA tramite biopsia stereotassica cerebrale. Il quinto caso è stato diagnosticato solo con MRI. Differenze statisticamente significative nell'analisi univariata sono state identificate per sesso ed età. Le due popolazioni non differiscono né per le caratteristiche della patologia (grado di LNH e stadio alla diagnosi) né per l'incidenza dei pazienti per i quali sono state richieste consulenze neurologiche. La figura 10A descrive la distribuzione delle due popolazioni basata su l'anno di diagnosi di LNH, e mostra come la popolazione non esposta sia almeno in parte "storica" (follow up medio: 4.7 ± 3.4 vs 4.0 ± 3.4 , nei non esposti e negli esposti a rituximab, rispettivamente). Durante il periodo di osservazione, l'andamento della percentuale di pazienti per i quali era richiesta visita specialistica neurologica era simile negli esposti rispetto ai non-esposti ($p=0.534$) (Figura 10B). La tabella 8 mostra l'incidenza, RD e RD aggiustato per PML nei pazienti esposti a rituximab e non esposti ai controlli.

Tabella 8: Incidence rate, RD non-aggiustato and RD aggiustato x 1000 py per PML nei pazienti esposti a rituximab in confronto ai controlli non-esposti

Esposizione a rituximab	IR (95%CI)	RD non aggiustato (95%CI)	* RD aggiustato (95%CI)
Non-esposti	0.0 (0.0-1.8)	-	-
Esposti	2.4 (1.0-5.6)	2.4 (0.3 – 4.5)	2.2 (0.1 – 4.3)

*Sesso ed età; IR: incidence rate, RD: rate difference, PML: leucoencefalopatia multifocale progressiva, py: anni-paziente

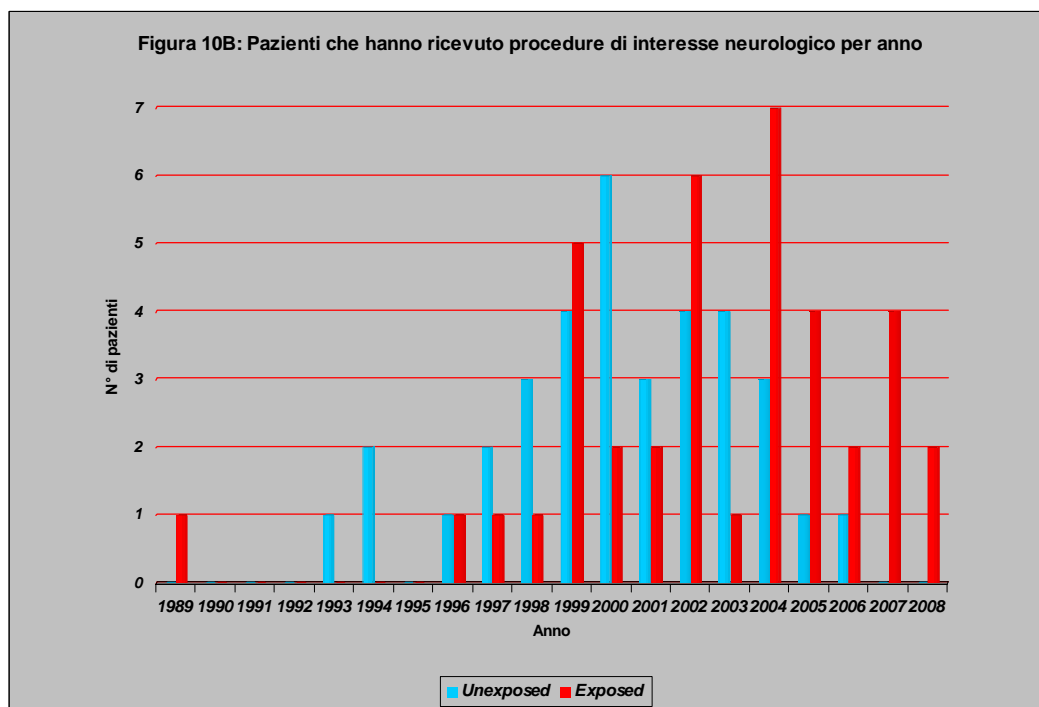
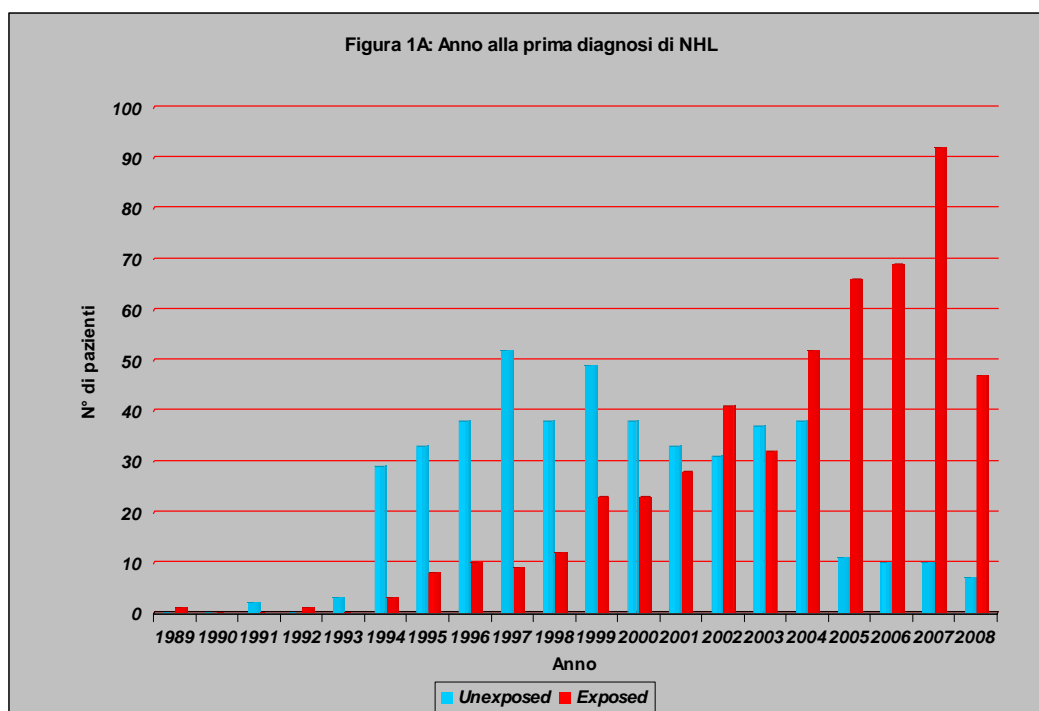


Figure 10: A) Distribuzione dei pazienti per anno alla prima diagnosi di NHL; B) Distribuzione dei pazienti che hanno ricevuto una procedura diagnostica di interesse neurologico per anno. (dati registrati fino ad Aprile 2008) *CT scan, MRI, visite neurologiche

8. DISCUSSIONE

La PML non si manifesta comunemente nei pazienti HIV-negativi con disturbi linfoproliferativi, ed è stata osservata raramente durante la terapia con rituximab (Pelosini et al., 2008; Carson et al., 2009B; Tuccori et al., 2009B). Il coinvolgimento delle terapie antitumorali nella PML non è conclusivo (Weber, 2009), e il possibile contributo di altri farmaci oltre rituximab nell'insorgenza di PML nei casi che abbiamo osservato non può essere escluso. Comunque il caso 4, che ha sviluppato PML in completa remissione e senza altro trattamento oltre a rituximab da 18 mesi, rende la causalità altamente sospetta. Sebbene l'immunodeficienza sia riconosciuta come una condizione necessaria per lo sviluppo di PML, il meccanismo dal quale JCV attraversa la BBB rimane dubbio. Il recettore 2A della serotonina (5-HT_{2A}R) sembra essere coinvolto nell'internalizzazione JCV nelle cellule gliali e alcuni antagonisti del recettore della serotonina (i.e., risperidone, mirtazapina) sono stati proposti come potenziali farmaci in grado di bloccare l'entrata di JCV (Elphick et al., 2004; Cettomai and McArthur, 2009). Due dei casi descritti hanno ricevuto mirtazapina e/o risperidone come tentativo di terapia di trattamento, ma questi farmaci non hanno fornito effetti benefici apprezzabili. Il caso 5 ha mostrato un ritardo nella progressione della lesione primaria, ma nuove lesioni focali sono state osservate in concomitanza. Coerentemente a recenti ricerche (Chapagain et al., 2007; Chapagain et al., 2008), l'esito non favorevole nei nostri pazienti suggerisce che JCV può utilizzare siti differenti, oltre a 5-HT_{2A}R, per attraversare la BBB.

Dalla valutazione dell'incidenza di PML in pazienti con LNH esposti a rituximab è emerso che questa eccede quella osservata nei pazienti che sono tradizionalmente considerati ad alto rischio di PML, cioè i pazienti affetti da leucemia linfocitica (Bower JH et al., 1997) cronica a cellule B e AIDS (Engsig FN et al., 2009). In accordo con quanto osservato in

uno studio recente condotto da Vidal et al., rituximab può essere considerato un potenziale fattore che contribuisce allo sviluppo di PML in questi pazienti (Vidal et al., 2009).

Altre considerazioni emergono dalla valutazione del rischio nei pazienti esposti a rituximab rispetto ai non esposti. Il nostro studio suggerisce un aumento dell'insorgenza di PML in un intervallo di 1- 24 casi ogni 1000 anni/paziente di esposizione a rituximab in confronto ai pazienti non esposti. Il rischio è comunque piuttosto ridotto, tanto da non superare i benefici su mortalità e sopravvivenza associati al trattamento con rituximab nella maggior parte dei pazienti con LNH. Inoltre, nonostante la figura 10B suggerisca l'assenza di bias di notorietà nel periodo in studio, i nostri risultati probabilmente sovrastimano il rischio di PML a causa delle limitazioni elencate di seguito. Primo, il numero dei casi di PML è ridotto e limitato ad un unico centro, ciò interferisce sulla stabilità dell'inferenza statistica. Sulla base della rarità della PML nei pazienti LNH, uno studio caso-controllo multicentrico, dovrebbe rappresentare il metodo più adatto di indagine per questo argomento. Secondo, la coorte non esposta è stata principalmente reclutata nel periodo pre-rituximab e ciò potrebbe comportare fattori di confondimento non evidenziati. Tuttavia, dato che rituximab ha mostrato comprovata efficacia nel trattamento del LNH, ragioni etiche impediscono attualmente agli sperimentatori di disegnare studi con gruppi di controllo non esposti. Di conseguenza, in studi futuri sarà difficile selezionare una popolazione di controllo diversa da una coorte storica o interna. Terzo, non siamo stati capaci di aggiustare il rischio in base ai trattamenti chemioterapici data l'estrema variabilità dei farmaci, delle dosi e dei tempo di esposizione che potrebbero influire negativamente sulla forza del modello statistico. Comunque, dato che la distribuzione del grado di LNH e lo stadio alla diagnosi sono le stesse nelle due popolazioni, sembra ragionevole supporre che entrambi le popolazioni fossero esposte a chemioterapie standard molto simili (per esempio, è ragionevole aspettarsi che i pazienti che ricevono la terapia R-CHOP si confrontino con i controlli che ricevevano CHOP nel periodo pre-rituximab).

9. CONCLUSIONI

La terapia con rituximab può aumentare il rischio di sviluppare la PML, sebbene il rischio assoluto di contrarre questa patologia sia basso. L'uso di rituximab esteso a diversi settori della medicina deve presupporre una corretta conoscenza, da parte sia dei medici che dei pazienti, del rischio di PML associato al trattamento con rituximab. Lo sviluppo di una maggiore consapevolezza della possibilità che rituximab possa favorire l'insorgenza di PML e la relativa segnalazione di eventuali casi osservati alle autorità regolatorie sono requisiti essenziali per migliorare le conoscenze sui fattori di rischio, sul decorso naturale e sulle strategie terapeutiche alternative. La diagnosi precoce di PML facilita la ricostituzione immunologica che può essere efficace nell'aumentare la sopravvivenza. Inoltre una diagnosi precoce, che preceda la comparsa dei danni neurologici permanenti, sarà fondamentale per la valutazione dell'efficacia di un nuovo trattamento antivirale.

I casi di PML che abbiamo presentato sostengono l'ipotesi che l'esposizione a rituximab può essere un fattore di rischio indipendente per lo sviluppo della PML. Inoltre, gli antagonisti 5-HT_{2A}R sono risultati inefficaci in due dei nostri casi, e questo ci pone di fronte alla necessità di individuare opzioni terapeutiche mirate.

I pazienti HIV-negativi con LNH trattati con rituximab possono essere considerati come una popolazione con un elevato rischio di sviluppo di PML. I nostri dati suggeriscono che l'esposizione a rituximab contribuisce significativamente a questo rischio, sebbene rimangono alcune incertezze a causa di potenziali errori non valutati. Uno studio caso controllo multicentrico è necessario per migliorare le conoscenze sul ruolo di rituximab nello sviluppo di PML nei pazienti HIV negativi con LNH. Nel frattempo, il nostro studio fornisce uno dei migliori approcci disponibili per valutare il rischio.

L'evoluzione della conoscenza sul profilo di sicurezza di rituximab nella scorsa decade potrebbe portare ad un'immediata azione regolatoria dopo una valutazione attenta del

bilancio rischio/beneficio che sembra dipendere in gran parte dall'indicazione terapeutica per il quale rituximab viene usato. Recentemente, tre casi di PML in pazienti con psoriasi sono stati considerati come sufficienti a sospendere efalizumab dal commercio, ma l'importanza di un'indicazione che non mette in pericolo di vita (psoriasi) e una scarsa efficacia farmacologica, gioca un ruolo maggiore nei riguardi di questa decisione estrema [Molloy E et al., 2009]. Basandoci su questo presupposto, potrebbe essere utile ridiscutere l'impiego di rituximab nel trattamento di patologie autoimmuni indolenti e nel trattamento di mantenimento nei pazienti con NHL in completa remissione. Rituximab rappresenta comunque attualmente un farmaco terapeutico essenziale e forse insostituibile che ha cambiato la storia naturale del linfoma non-Hodgkin.

BIBLIOGRAFIA

Agostini HT, Yanagihara R, Davis V, et al. Asian genotypes of JC virus in Native Americans and in a Pacific Island population: markers of viral evolution and human migration. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(26):14542–6.

Agostini HT, Ryschkewitsch CF, Singer EJ, Stoner GL. JC virus regulatory region rearrangements and genotypes in progressive multifocal leukoencephalopathy: two independent aspects of virus variation. *J Gen Virol* 1997;78:659-64.

Andrei G, Snoeck R, Vandeputte M, et al. Activities of various compounds against murine and primate polyomaviruses. *Antimicrobial Agents Chemother* 1997;41(3):587–93.

Antinori A, Ammassari A, De Luca A, et al. Diagnosis of AIDS-related focal brain lesions: a decision-making analysis based on clinical and neuroradiologic characteristics combined with polymerase chain reaction assays in CSF. *Neurology* 1997;48(3):687–94.

Antinori A, Cingolani A, Lorenzini P, et al. Clinical epidemiology and survival of progressive multifocal leukoencephalopathy in the era of highly active antiretroviral therapy: data from the Italian Registry Investigative Neuro AIDS (IRINA). *J Neurovirol* 2003;9(Suppl 1):47–53.

Åström K-E, Mancall EL, Richardson EP. Progressive multifocal leuko-encephalopathy. A hitherto unrecognized complication of chronic lymphatic leukaemia and Hodgkin's disease. *Brain* 1958;81:93–111.

Baltazar S et al. CNOP vs. CNOP-rituximab cv. rituximab alone as first line therapy for indolent non-Hodgkin's lymphoma (INHL): preliminary disease-free/overall survival analysis [abstract no. 028]. 10th Congress of the European Haematology Association; 2005 Jun 2-5; Stockholm, Sweden.

- Bauer WR, Turel APJ, Johnson KP. Progressive multifocal leukoencephalopathy and cytarabine. Remission with treatment. *JAMA* 1973;226(2):174–6.
- Berenguer J, Miralles P, Arrizabalaga J, et al. Clinical course and prognostic factors of progressive multifocal leukoencephalopathy in patients treated with highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 2003;36(8):1047–52.
- Berger JR, Concha M. Progressive multifocal leukoencephalopathy: the evolution of a disease once considered rare. *J Nephrol* 1995;1(1):5–18.
- Berger JR, Gallo B, Concha M. Progressive multifocal leukoencephalopathy. In: Berger JR, Levy RM, editors. *AIDS and the nervous system*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p. 569–94.
- Berger JR, Levy RM, Flomenhoft D, et al. Predictive factors for prolonged survival in acquired immunodeficiency syndrome-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann Neurol* 1998;44(3):341–9.
- Berger JR, Pall L, Lanska D, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with HIV infection. *J Neurovirol* 1998;4(1):59–68.
- Berger JR, Pall L, McArthur J, et al. A pilot study of recombinant alpha 2a interferon in the treatment of AIDS-related progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurology* 1992;42(Suppl 3):257.
- Bhatnagar A, Sheffler DJ, Kroeze WK, et al. Caveolin-1 interacts with 5-HT_{2A} serotonin receptors and profoundly modulates the signaling of selected G α q-coupled protein receptors. *J Biol Chem* 2004;279(33):34614–23.
- Biogen Idec Inc., Genentech Inc. Rituxan[®] (Rituximab): prescribing information. 2006 Feb 2008.

- Blick G, Whiteside M, Griegor P, et al. Successful resolution of progressive multifocal leukoencephalopathy after combination therapy with cidofovir and cytosine arabinoside. *Clin Infect Dis* 1998;26(1):191–2.
- Bollag B, Chuke WF, Frisque RJ. Hybrid genomes of the polyomaviruses JC virus, BK virus, and simian virus 40: identification of sequences important for efficient transformation. *J Virol* 1989;63(2):863–72.
- Bollag B, Kilpatrick LH, Tyagarajan SK, et al. JC virus T'135, T'136 and T'165 proteins interact with cellular p107 and p130 in vivo and influence viral transformation potential. *J Neurovirol* 2006;12(6):428–42.
- Bollag B, Prins C, Snyder EL, et al. Purified JC virus T and T' proteins differentially interact with the retinoblastoma family of tumor suppressor proteins. *Virology* 2000;274(1):165–78.
- Bonavita Simona et al. Infratentorial progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient treated with fludarabine and rituximab. *Neurol Sci.* 2008;29:37-39.
- Bossolasco S, Calori G, Moretti F, et al. Prognostic significance of JC virus DNA levels in cerebrospinal fluid of patients with HIV-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Clin Infect Dis* 2005;40(5):738–44.
- Brooks BR, Walker DL. Progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurol Clin* 1984;2(2):299–313.
- Byrd JC et al. Addition of rituximab to fludarabine may prolong progression-free survival and overall survival in patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: an update retrospective comparative analysis of CALCG 9712 and CALGB 9011. *Blood* 2005 Jan 1; 105 (1): 49-53.

Byrd JC et al. Randomized phase 2 study of fludarabine with concurrent versus sequential treatment with rituximab in symptomatic, untreated patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B 9712 (CALGB 9712). *Blood* 2003 Jan 1; 101 (1): 6-14.

Carson KR, Focosi D, Major EO et al. Monoclonal antibody-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in patients treated with rituximab, natalizumab and efalizumab: a review from the Research on Adverse Drug events And Reports (RADAR) project. *Lancet Oncol* 2009;10:816-24

Cavanagh JB, GreenbaumD,Marshall AHE, et al. Cerebral demyelination associated with disorders of the reticuloendothelial system. *Lancet* 1959;274(7102):524–9.

Chang H, Wang M, Tsai RT, et al. High incidence of JC viruria in JC-seropositive older individuals. *J Neurovirol* 2002;8(5):447–51.

Chang L, Ernst T, Tornatore C, et al. Metabolite abnormalities in progressive multifocal leukoencephalopathy by proton magnetic resonance spectroscopy. *Neurology* 1997;48:836–45.

Cinque P, Brytting M, Vago L, et al. Epstein-Barr virus DNA in cerebrospinal fluid from patients with AIDS-related primary lymphoma of the central nervous system. *Lancet* 1993;342(8868):398–401.

Cinque P, Pierotti C, Vigano MG, et al. The good and evil of HAART in HIV-related progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurovirol* 2001;7(4):358–63.

Clifford DB, Yiannoutsos C, GlicksmanM, et al. HAART improves prognosis in HIV-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurology* 1999;52(3):623–5.

Croul S, Otte J, Khalili K. Brain tumors and polyomaviruses. *J Neurovirol* 2003;9(2):173–82.

- Darbinyan A, Darbinian N, Safak M, et al. Evidence for dysregulation of cell cycle by human polyomavirus, JCV, late auxiliary protein. *Oncogene* 2002;21(36):5574–81.
- De Luca A, Fantoni M, Tartaglione T, et al. Response to cidofovir after failure of antiretroviral therapy alone in AIDS-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurology* 1999;52(4):891–2.
- De Luca A, Giancola ML, Ammassari A, et al. Potent anti-retroviral therapy with or without cidofovir for AIDS- associated progressive multifocal leukoencephalopathy: extended follow- up of an observational study. *J Neurovirol* 2001;7(4):364–8.
- De Luca A, Giancola ML, Ammassari A, et al. The effect of potent antiretroviral therapy and JC virus load in cerebrospinal fluid on clinical outcome of patients with AIDS-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Infect Dis* 2000;182(4):1077–83.
- Devireddy LR, Kumar KU, Pater MM, et al. BAG-1, a novel Bcl-2-interacting protein, activates expression of human JC virus. *J Gen Virol* 2000;81(Pt 2):351–7.
- Dodge RT. A case study: the use of cidofovir for the management of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Assoc Nurses AIDS Care* 1999;10(4):70–4.
- Dörries K. New aspects in the pathogenesis of polyomavirus-induced disease. *Adv Virus Res* 1997;48:205–61.
- Dreyling MH et al. Combined immuno-chemotherapy results in superior remission rates and overall survival in recurrent follicular and mantle cell lymphoma: follow-up of a prospective randomized trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG) [abstract no. 6528 plus oral presentation]. *J Clin Oncol* 2005 Jun 1; 23 (Pt 1 Suppl. 16): 567.

- Du Pasquier RA, Kuroda MJ, Zheng Y, et al. A prospective study demonstrates an association between JC virus-specific cytotoxic T lymphocytes and the early control of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Brain* 2004;127:1970–8.
- Du Pasquier RA, Schmitz JE, Jean-Jacques J, et al. Detection of JC virus-specific cytotoxic T lymphocytes in healthy individuals. *J Virol* 2004;78(18):10206–10.
- Dubois V, Moret H, Lafon ME, et al. Prevalence of JC virus viraemia in HIV-infected patients with or without neurological disorders: a prospective study. *J Neurovirol* 1998;5(5):539–44.
- Dworkin MS, Wan PC, Hanson DL, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy: improved survival of human immunodeficiency virus-infected patients in the protease inhibitor era. *J Infect Dis* 1999;180(3):621–5.
- Eash S, Tavares R, Stopa EG, et al. Differential distribution of the JC virus receptor-type sialic acid in normal human tissues. *Am J Pathol* 2004;164(2):419–28.
- Elliot B, Aromin I, Gold R, et al. 2.5 year remission of AIDS-associated progressive multifocal leukoencephalopathy with combined antiretroviral therapy. *Lancet* 1997;349:850.
- Ellison GW. Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML). I. Investigation of the immunologic status of a patient with lymphosarcoma and PML. *J Neuropathol Exp Neurol* 1969;28(3):501–6.
- Elphick GF, Querbes W, Jordan JA, et al. The human polyomavirus, JCV, uses serotonin receptors to infect cells. *Science* 2004;306(5700):1380–3.
- Eng PM, Turnbull BR, Cook SF, et al. Characteristics and antecedents of progressive multifocal leukoencephalopathy in an insured population. *Neurology* 2006;67(5):884–6.

FDA ALERT [12/18/2006] <http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/rituximab/default.htm>
(accessed 21/02/2009).

Feugier P et al. Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol* 2005 Jun 20; 23 (18): 4117-26.

Focosi D, Fazzi R, Montanaro D, Emdin M, Petrini M. Progressive multifocal leukoencephalopathy in a haploidentical stem cell transplant recipient: a clinical, neuroradiological and virological response after treatment with risperidone. *Antiviral Res* 2007; 74:156-8

Focosi D, Kast RE, Maggi F, Ceccherini-Nelli L, Petrini M. Risperidone-induced reduction in JC viruria as a surrogate marker for efficacy against progressive multifocal leukoencephalopathy and hemorrhagic cystitis. *J Clin Virol* 2007b;39:63-4

Fong IW, Britton CB, Luinstra KE, et al. Diagnostic value of detecting JC virus DNA in cerebrospinal fluid of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Clin Microbiol* 1995;33(2):484–6.

Fong IW, Toma E. The natural history of progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with AIDS. Canadian PML Study Group. *Clin Infect Dis* 1995;20(5):1305–10.

Forstpointer R et al. The addition of rituximab to a combination of fludarabine, cyclophosphamide, mitoxantrone (FCM) significantly increases the response rate and prolongs the survival as compared with FCM alone in patients with relapsed and refractory follicular and mantle cell lymphoma: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood* 2004 Nov 15; 104 (10): 3064-71.

Frisque RJ, Bream GL, Cannella MT. Humanpolyomavirus JCvirus genome. *J Virol* 1984;51(2):458–69.

- Frisque RJ. Structure and function of JC virus T' proteins. *J Neurovirol* 2001;7(4):293–7.
- Frye S, Trebst C, Dittmer U, et al. Efficient production of JC virus in SVG cells and the use of purified viral antigens for analysis of specific humoral and cellular immune response. *J Virol Methods* 1997;63(1–2):81–92.
- Garcia De Viedma D, Diaz Infantes M, Miralles P, et al. JC virus load in progressive multifocal leukoencephalopathy: analysis of the correlation between the viral burden in cerebrospinal fluid, patient survival, and the volume of neurological lesions. *Clin Infect Dis* 2002;34(12):1568–75.
- Garcia-Suarez et al. JC papovavirus leukoencephalopathy after first line treatment with CHOP and rituximab. *Haematologica*. 2007;92(9)e101.
- Garcia-Suarez J, de Miguel D, Krsnik I, et al. Changes in the natural history of progressive multifocal leukoencephalopathy in HIV-negative lymphoproliferative disorders: impact of novel therapies. *Am J Hematol* 2005;80(4):271–81.
- Garvey L, Thomson EC, Taylor GP. Progressive multifocal leukoencephalopathy: prolonged survival in patients treated with protease inhibitors and cidofovir: a case series. *AIDS* 2006;20(5):791–3.
- Gasnault J, Kousignian P, Kahraman M, et al. Cidofovir in AIDS-associated progressive multifocal leukoencephalopathy: a monocenter observational study with clinical and JC virus load monitoring. *J Neurovirol* 2001;7(4):375–81.
- Gasnault J, Taoufik Y, Goujard C, et al. Prolonged survival without neurological improvement in patients with AIDS-related progressive multifocal leukoencephalopathy on potent combined antiretroviral therapy. *J Neurovirol* 1999;5(4):421–9.

Geschwind M, Skolasky R, Royal W, et al. The relative contributions of HAART and alpha-interferon for therapy of progressive multifocal leukoencephalopathy in AIDS. *J Neurovirol* 2001;7(4):353–7.

Ghielmini M et al. Prolonged treatment with rituximab in patients with follicular lymphoma significantly increases event-free survival and response duration compared with the standard weekly x 4 schedule. *Blood* 2004 Jun 15; 103 (12): 4416-23.

Gillespie SM, Chang Y, Lemp G, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy in persons infected with human immunodeficiency virus, San Francisco, 1981–1989. *Ann Neurol* 1991;30(4):597–604.

Gillison ML, Chen R, Goshu E, et al. Human retinoblastoma is not caused by known pRb-inactivating human DNA tumor viruses. *Int J Cancer* 2007;120(7):1482–90.

Giudici B, Vaz B, Bossolasco S, et al. Highly active antiretroviral therapy and progressive multifocal leukoencephalopathy: effects on cerebrospinal fluid markers of JC virus replication and immune response. *Clin Infect Dis* 2000;30(1):95–9.

Goldberg SL et al. Unusual viral infections (progressive multifocal leukoencephalopathy and cytomegalovirus disease) after high-dose chemotherapy with autologous blood stem cell rescue and peritransplantation rituximab. *Blood* 2002;99:1486-8.

Goldmann C, Petry H, Frye S, et al. Molecular cloning and expression of major structural protein VP1 of the human polyomavirus JC virus: formation of virus-like particles useful for immunological and therapeutic studies. *J Virol* 1999;73(5):4465–9.

Goldmann C, Stolte N, Nisslein T, et al. Packaging of small molecules into VP1-virus-like particles of the human polyomavirus JC virus. *J Virol Methods* 2000;90(1):85–90.

Guillaume B, Sindic CJ, Weber T. Progressive multifocal leukoencephalopathy: simultaneous detection of JCV DNA and anti-JCV antibodies in the cerebrospinal fluid. *Eur J Neurol* 2000;7(1):101–6.

Habermann W et al. Rituximab-CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large-B cell lymphoma [abstract no. 225]. *Ann Oncol* 2005 Jun; 16 Suppl. 5: v103.

Hainsworth JD et al. Maximizing therapeutic benefit of rituximab: maintenance therapy versus retreatment at progression in patients with indolent non-Hodgkin's lymphoma – a randomized phase II trial of the Minnie Pearl Cancer Research Network . *J Clin Oncol* 2005 Feb 20; 23 (6): 1088-95.

Hall CD, Dafni U, Simpson D, et al. Failure of cytarabine in progressive multifocal leukoencephalopathy associated with human immunodeficiency virus infection. AIDS Clinical Trials Group 243 Team. *N Engl J Med* 1998;338(19):1345–51.

Hallervorden J. Eigenartige und nicht rubrizierbare prozesse. In: Bumke O, editor. *Handbuch der Geisteskrankheiten Die Anatomie der Psychosen*. Berlin: Springer; 1930. p. 1036–107.

Hamilton RS, Gravell M, Major EO. Comparison of antibody titers determined by hemagglutination inhibition and enzyme immunoassay for JC virus and BK virus. *J Clin Microbiol* 2000;38(1):105–9.

Heide W, Kömpf D, Reusche E, et al. Failure of cytarabine/interferon therapy in progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann Neurol* 1995;37(3):412–3.

Henson JW, Schnitker BL, Lee TS, et al. Cell-specific activation of the glial-specific JC virus early promoter by large T antigen. *J Biol Chem* 1995;270(22):13240–5.

Herold M et al. Rituximab plus mitoxantrone, chlorambucil, prednison (R-MCP) is superior to MCP alone in advanced indolent and follicular lymphoma – results of a phase III study (OSHO39) [abstract no. 350 plus oral presentation]. Ann Oncol 2005; 16 Suppl. 5: v51-2.

Herrlinger U, Schwarzler F, Beck R, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy: cidofovir therapy in three patients with underlying hematological disease. J Neurol 2003;250(5):612–4.

Hiddemann W et al. Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. Blood 2005 Dec 1; 106 (12): 3725-32.

Hiroki Yokoyama et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient with B-cell lymphoma during rituximab-containing chemotherapy: case report and review of the literature. International Journal of Hematology. 2008.

Hochster HS et al. Maintenance rituximab after CVP results in superior clinical outcome in advanced follicular lymphoma (FL): results of the E1496 phase III trial from the Eastern Cooperative Oncology Group and the Cancer and Leukemia Group B [abstract no. 349 plus oral presentation]. Blood 2005 Nov 16; 106 (11 Part 1): 106.

Hoffmann C, Horst HA, Albrecht H, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy with unusual inflammatory response during antiretroviral treatment. J Neurol Neurosurg Psychiatr 2003;74(8):1142–4.

Hogan TF, Borden EC, McBain JA, et al. Human polyomavirus infections with JC virus and BK virus in renal transplant patients. Ann Intern Med 1980;92(3):373–8.

Holman RC, Janssen RS, Buehler JW, et al. Epidemiology of progressive multifocal leukoencephalopathy in the United States: analysis of national mortality and AIDS surveillance data. *Neurology* 1991;41(11):1733–6.

Houff SA, Major EO, Katz DA, et al. Involvement of JC virus-infected mononuclear cells from the bone marrow and spleen in the pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med* 1988;318(5):301–5.

Houston S, Roberts N, Mashinter L. Failure of cidofovir therapy in progressive multifocal leukoencephalopathy unrelated to human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 2001;32(1):150–2.

Huang D, Cossoy M, Li M, et al. Inflammatory progressive multifocal leukoencephalopathy in human immunodeficiency virus-negative patients. *Ann Neurol* 2007;62(1):34–9.

Huang SS, Skolasky RL, Dal Pan GJ, et al. Survival prolongation in HIV-associated progressive multifocal leukoencephalopathy treated with alpha-interferon: an observational study. *J Neurovirol* 1998;4(3):324–32.

Important drug warning updated safety information. Available at: Genentech biogenidec 2006. Available at: www.rituxan.com/ra/content/Rituxan_DHCP_letter. Accessed July 1, 2005.

Iranzo A, Moreno A, Pujol J, et al. Proton magnetic resonance spectroscopy pattern of progressive multifocal leukoencephalopathy in AIDS. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1999;66(4):520–3.

Jaeckle KA, PrzepiorkaD, Birdwell RR, et al. Favorable response of progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) to treatment with interleukin-2. *Neurology* 1997;48(Suppl 2):A26.

Jellinger KA, Setinek U, Drlicek M, et al. Neuropathology and general autopsy findings in AIDS during the last 15 years [In Process Citation]. *Acta Neuropathol (Berl)* 2000;100(2):213–20.

Kaniowska D, Kaminski R, Amini S, et al. Cross-interaction between JC virus agnoprotein and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Tat modulates transcription of the HIV-1 long terminal repeat in glial cells. *J Virol* 2006;80(18):9288–99.

Kaplan LD et al. rituximab does not improve clinical outcome in a randomized phase III trial of CHOP with or without rituximab in patients with HIV-associated non-Hodgkin's lymphoma: AIDS-malignancies consortium trial 010. *Blood* 2005 May 24.

Keating MJ et al. Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2005 Jun 20; 23 (18): 4079-88.

Kerr DA, Chang CF, Gordon J, et al. Inhibition of human neurotropic virus (JCV) DNA replication in glial cells by camptothecin. *Virology* 1993;196(2):612–8.

Khalili K. Human neurotropic JC virus and its association with brain tumors. *Dis Markers* 2001;17(3):143–7.

Kitamura T, Aso Y, Kuniyoshi N, et al. High incidence of urinary JC virus excretion in non-immunosuppressed older patients. *J Infect Dis* 1990;161(6):1128–33.

Kleinschmidt-DeMasters BK, Tyler KL. Progressive multifocal leukoencephalopathy complicating treatment with natalizumab and interferon beta-1a for multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2005;353(4):369–74.

Knight A, O'Brien P, Osoba D. “Spontaneous” progressive multifocal leukoencephalopathy. Immunologic aspects. *Ann Intern Med* 1972;77(2):229–33.

- Knowles WA, Gibson PE, Hand JF, et al. An M-antibody capture radioimmunoassay (MACRIA) for detection of JC virus-specific IgM. *J Virol Methods* 1992;40(1):95–105.
- Knowles WA, Luxton RW, Hand JF, et al. The JC virus antibody response in serum and cerebrospinal fluid in progressive multifocal leukoencephalopathy. *Clin Diagn Virol* 1995;4:183–94.
- Knowles WA, Sasnauskas K. Comparison of cell culture-grown JC virus (primary human fetal glial cells and the JCI cell line) and recombinant JCV VP1 as antigen for the detection of anti-JCV antibody by haemagglutination inhibition. *J Virol Methods* 2003;109(1):47–54.
- Komagome R, Sawa H, Suzuki T, et al. Oligosaccharides as receptors for JC virus. *J Virol* 2002;76(24):12992–3000.
- Koralnik IJ, Boden D, Mai VX, et al. JC virus DNA load in patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurology* 1999;52(2):253–60.
- Koralnik IJ, DuPasquier RA, Kuroda MJ, et al. Association of prolonged survival in HLA-A*23 progressive multifocal leukoencephalopathy patients with a CTL response specific for a commonly recognized JC virus epitope. PG-499-504. *J Immunol* 2002;168(1):499–504.
- Koralnik IJ. Overview of the cellular immunity against JC virus in progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurovirol* 2002;8(Suppl 2):59–65.
- Krynska B, Otte J, Franks R, et al. Human ubiquitous JCV(CY) T-antigen gene induces brain tumors in experimental animals. *Oncogene* 1999;18(1):39–46.
- Kunschner L, Scott TF. Sustained recovery of progressive multifocal leukoencephalopathy after treatment with IL-2. *Neurology* 2005;65(9):1510.

Langer-Gould A, Atlas SW, Green AJ, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient treated with natalizumab. *N Engl J Med* 2005;353(4):375–81.

Langer-Gould A, Steinman L. Progressive multifocal leukoencephalopathy and multiple sclerosis: lessons from natalizumab. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2006;6(3):253–8.

Levy RM, Major E, Ali MJ, et al. Convection-enhanced intraparenchymal delivery (CEID) of cytosine arabinoside (AraC) for the treatment of HIV-related progressive multifocal leukoencephalopathy (PML). *J Neurovirol* 2001;7(4):382–5.

Lima MA, Hanto DW, Curry MP, et al. Atypical radiological presentation of progressive multifocal leukoencephalopathy following liver transplantation. *J Neurovirol* 2005;11(1):46–50.

Lima MA, Marzocchetti A, Autissier P, et al. Frequency and phenotype of JC virus-specific CD8 β T lymphocytes in the peripheral blood of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Virol* 2007;81(7):3361–8.

Liu CK, Wei G, Atwood WJ. Infection of glial cells by the human polyomavirus JC is mediated by an N-linked glycoprotein containing terminal alpha(2–6)-linked sialic acids. *J Virol* 1998;72(6):4643–9.

Major EO, Mourrain P, Cummins C. JC virus-induced owl monkey glioblastoma cells in culture: biological properties associated with the viral early gene product. *Virology* 1984;136(2):359–67.

Major EO. Reemergence of PML in natalizumab-treated patients new cases, same concerns. *N England J Med* 2009;361:1041-3.

Marcus R et al. CVP chemotherapy plus rituximab compared with CVP as first-line treatment for advanced follicular lymphoma. *Blood* 2005 Feb 15; 105 (4): 1417-23.

- Marra CM, Rajicic N, Barker DE, Cohen BA, et al. A pilot study of cidofovir for progressive multifocal leukoencephalopathy in AIDS. *AIDS* 2002;16(13):1791–7.
- Martinez JV, Mazziotti JV, Efron ED, et al. Immune reconstitution inflammatory syndrome associated with PML in AIDS: a treatable disorder. *Neurology* 2006;67(9):1692–4.
- Marzocchetti A, Di Giambenedetto S, Cingolani A, et al. Reduced rate of diagnostic positive detection of JC virus DNA in cerebrospinal fluid in cases of suspected progressive multifocal leukoencephalopathy in the era of potent antiretroviral therapy. *J Clin Microbiol* 2005;43(8):4175–7.
- Matthews B. Symptoms and signs of multiple sclerosis. In: Compston A, Ebers G, Lassmann H, editors. *McAlpine's multiple sclerosis*. London: Churchill Livingstone; 1998. p. 145–90.
- Messam CA, Hou J, Gronostajski RM, et al. Lineage pathway of human brain progenitor cells identified by JC virus susceptibility. *Ann Neurol* 2003;53(5):636–46.
- Miller JR, Barrett RE, Britton CB, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy in a male homosexual with T-cell immune deficiency. *N Engl J Med* 1982;307(23):1436–8.
- Miralles P, Berenguer J, Lacruz C, et al. Inflammatory reactions in progressive multifocal leukoencephalopathy after highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2001;15(14):1900–2.
- Molloy ES, Calabrese LH. Therapy: Target but not trouble-free: efalizumab and PML. *Nat Rev Rheumatol* 2009; 5:418-9
- Monaco MC, Sabath BF, Durham LC, et al. JC virus multiplication in human hematopoietic progenitor cells requires the NF-1 class D transcription factor. *PGD* 9687–95. *J Virol* 2001;75(20).

Monaco MCG, Jensen PN, Hou J, et al. Detection of JC virus DNA in human tonsil tissue: evidence for site of initial viral infection [in Process Citation]. *J Virol* 1998;72(12):9918–23.

Moret H, Brodard V, Barranger C, et al. New commercially available PCR and microplate hybridization assay for detection and differentiation of human polyomaviruses JC and BK in cerebrospinal fluid, serum, and urine samples. *J Clin Microbiol* 2006;44(4):1305–9.

Neuenburg JK, Brodt HR, Herndier BG, et al. HIV-related neuropathology, 1985 to 1999: rising prevalence of HIV encephalopathy in the era of highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002;31(2):171–7.

Newcombe PA, Bush AC, Stoner GL, et al. No evidence of an association of JC virus and colon neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13(4):662–6.

Niino M, Bodner C, Simard ML, et al. Natalizumab effects on immune cell responses in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2006;59(5):748–54.

Oberlander T, et al. Major congenital malformations following prenatal exposure to serotonin reuptake inhibitors and benzodiazepines using population-based health data. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2008;83:68-76.

O'Brien et al. Results of the fludarabine and cyclophosphamide combination regimen in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2001 Mar 1; 19 (5): 1414-20.

Ohsumi S, Motoi M, Ogawa K. Induction of undifferentiated tumors by JC virus in the cerebrum of rats. *Acta Pathol Jpn* 1986;36(6):815–25.

Okada Y, Endo S, Takahashi H, et al. Distribution and function of JCV agnoprotein. *J Neurovirol* 2001;7(4):302–6.

Osorio S, De La Camara R, Golbano N, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy after stem cell transplantation, unsuccessfully treated with cidofovir. *Bone Marrow Transplant* 2002;30(12):963–6.

Padgett BL, Walker DL, Zu Rhein GM, et al. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Lancet* 1971;297(7712):1257–60.

Pelosini M, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy: report of three cases in HIV-negative hematological patients and review of literature. *Ann Hematol* 2007;87(5):405-12.

Pfreundschuh M et al. Six, not eight cycle of bi-weekly CHOP with rituximab (R-CHOP-14) is the preferred treatment for elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): results of the RICOVER-60 trial of the German High-Grade Non Hodgkin Lymphoma Study Group (DSHNHL) [abstract no. 13 plus oral presentation]. *Blood* 2005 Nov 16; 106 (11).

Pho MT, Ashok A, Atwood WJ. JC virus enters human glial cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *J Virol* 2000;74(5):2288–92.

Post MJ, Yiannoutsos C, Simpson D, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy in AIDS: are there any MR findings useful to patient management and predictive of patient survival? AIDS Clinical Trials Group, 243 Team. *AJNR Am J Neuroradiol* 1999;20(10):1896–906.

Power C, Gladden JG, Halliday W, et al. AIDS- and non-AIDS-related PML association with distinct p53 polymorphism. *Neurology* 2000;54(3):743–6.

Rai KR et al. Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000 Dec 14; 343 (24):1750-7.

- Raj GV, Khalili K. Transcriptional regulation: lessons from the human neurotropic polyomavirus, JCV. *Virology* 1995;213(2):283–91.
- Ravichandran V, Sabath BF, Jensen PN, et al. Interactions between c-Jun, Nuclear Factor-1 and JC virus promoter sequences: implications for viral tropism. *J Virol* 2006;80(21):10506–13.
- Re D, Bamborschke S, Feiden W, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy after autologous bone marrow transplantation and alpha-interferon immunotherapy. *Bone Marrow Transplant* 1999;23(3):295–8.
- Ricciardiello L, Chang DK, Laghi L, et al. Mad-1 is the exclusive JC virus strain present in the human colon, and its transcriptional control region has a deleted 98-base-pair sequence in colon cancer tissues. *J Virol* 2001;75(4):1996–2001.
- Richardson EPJ. Progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med* 1961;265:815–23.
- Risto S. et al. Rituximab. A Review of its Use in Non-Hodgkin's Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Drugs*. 2006;66(6):791-820.
- Roche Registration Limited. MabThera 100 mg (concentrate for solution for infusion): summary of product characteristics [online]. Available from URL: www.rocheuk.com [Accessed 2006 Mar 10].
- Rollison DE, Engels EA, Halsey NA, et al. Prediagnostic circulating antibodies to JC and BK human polyomaviruses and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15(3):543–50.
- Rollison DE, Helzlsouer KJ, Alberg AJ, et al. Serum antibodies to JC virus, BK virus, simian virus 40, and the risk of incident adult astrocytic brain tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12(5):460–3.

- Roskopf J, Trofe J, Stratta RJ, et al. Pharmacotherapeutic options for the management of human polyomaviruses. *Adv Exp Med Biol* 2006;577:228–54.
- RoyalWIII, Dupont B, McGuire D, et al. Topotecan in the treatment of acquired immunodeficiency syndrome-related progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurovirol* 2003;9(3):411–9.
- Sabath BF, Major EO. Traffic of JC virus from sites of initial infection to the brain: the path to progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Infect Dis* 2002;186:S180–6.
- Sacktor N, Lyles RH, Skolasky R, et al. HIV-associated neurologic disease incidence changes: multicenter AIDS Cohort Study, 1990–1998. *Neurology* 2001;56(2):257–60.
- Sadowska B, Barrucco R, Khalili K, et al. Regulation of human polyomavirus JC virus gene transcription by AP-1 in glial cells. *J Virol* 2003;77(1):665–72.
- Safak M, Barrucco R, Darbinyan A, et al. Interaction of JC virus agnoprotein with T antigen modulates transcription and replication of the viral genome in glial cells. *J Virol* 2001;75(3):1476–86.
- Safak M, Khalili K. Physical and functional interaction between viral and cellular proteins modulate JCV gene transcription. *J Neurovirol* 2001;7(4):288–92.
- Safdar A, Rubocki RJ, Horvath JA, et al. Fatal immune restoration disease in human immunodeficiency virus type 1-infected patients with progressive multifocal leukoencephalopathy: impact of antiretroviral therapy-associated immune reconstitution. *Clin Infect Dis* 2002;35(10):1250–7.
- Salles GA et al. Rituximab added to aIFN plus CHVP improve the outcome of follicular lymphoma patients with a high tumor burden: first analysis of the GELA-GOELAMS FL-2000 randomized trial in 359 patients [abstract no. 160]. *Blood* 2004 Nov 16; 104 (11 Pt 1): 49-50a.

- Salmaggi A, Maccagnano E, Castagna A, et al. Reversal of CSF positivity for JC virus genome by cidofovir in a patient with systemic lupus erythematosus and progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurol Sci* 2001;22(1):17–20.
- San-Andres FJ, Rubio R, Castilla J, et al. Incidence of acquired immunodeficiency syndrome-associated opportunistic diseases and the effect of treatment on a cohort of 1115 patients infected with human immunodeficiency virus, 1989–1997. *Clin Infect Dis* 2003;36(9):1177–85.
- Sandborn WJ, Colombel JF, Enns R, et al. Natalizumab induction and maintenance therapy for Crohn’s disease. *N Engl J Med* 2005;353(18):1912–25.
- Sarah M. et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy after rituximab in a case of non-Hodgkin lymphoma. *Neurology* 69. 2007.
- Schulz H et al. Does combined immunochemotherapy with the monoclonal antibody rituximab improve overall survival in the treatment of patients with indolent non-Hodgkin’s lymphoma? Preliminary results of a comprehensive meta-analysis [abstract no. 351 plus oral presentation]. *Blood* 2005 Nov 16; 106 (11 Part 1): 106-7.
- Shackelton LA, Rambaut A, Pybus OG, et al. JC virus evolution and its association with human populations. *J Virol* 2006;80(20):9928–33.
- Shah KV, Daniel RW, Strickler HD, Goedert JJ. Investigation of human urine for genomic sequences of the primate polyomaviruses simian virus 40, BK virus, and JC virus. *J Infect Dis* 1997;176:1618-21.
- Silva MT, Araujo A. Highly active antiretroviral therapy access and neurological complications of human immunodeficiency virus infection: impact versus resources in Brazil. *J Neurovirol* 2005;11(Suppl 3):11–5.

- Simone IL, Federico F, Tortorella C, et al. Localised ¹H-MR spectroscopy for metabolic characterisation of diffuse and focal brain lesions in patients infected with HIV. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1998;64(4):516–23.
- Sindic CJ, Trebst C, Van Antwerpen MP, et al. Detection of CSF-specific oligoclonal antibodies to recombinant JC virus VP1 in patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neuroimmunol* 1997;76(1–2):100–4.
- Skromne E, Rivera VM, Ontaneda D, et al. Progression of progressive multifocal leukoencephalopathy despite treatment with beta-interferon. *Neurology* 2006;66(11):1787–8, author reply -8.
- Solal-Caligny P et al. Mabthera (rituximab) plus CVP chemotherapy for first-line treatment of stage III/IV follicular non-Hodgkin's lymphoma (NHL): confirmed efficacy with longer follow-up [abstract no. 350 plus oral presentation]. *Blood* 2005 Nov 16; 106 (11).
- Staib C, Pesch J, Gerwig R, et al. p53 inhibits JC virus DNA replication in vivo and interacts with JC virus large T-antigen. *Virology* 1996;219(1):237–46.
- Steiger MJ, Tarnesby G, Gabe S, et al. Successful outcome of progressive multifocal leukoencephalopathy with cytarabine and interferon. *Ann Neurol* 1993;33(4):407–11.
- Stuart L. et al. Unusual viral infections (progressive multifocal leukoencephalopathy and cytomegalovirus disease) after high-dose chemotherapy with autologous blood stem cell rescue and peritransplantation rituximab. *Blood*. 2002;99:1486-1488.
- Stuve O, Marra CM, Bar-Or A, et al. Altered CD4⁺/CD8⁺ T-cell ratios in cerebrospinal fluid of natalizumab-treated patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2006;63(10):1383–7.

Sumner C, Shinohara T, Durham L, et al. Expression of multiple classes of the Nuclear Factor-1 family in the developing human brain: differential expression of two classes of NF-1 genes. *J Neurovirol* 1996;2:87–100.

Taoufik Y, Gasnault J, Karaterki A, et al. Prognostic value of JC Virus load in cerebrospinal fluid of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Infect Dis* 1998;178(6):1816–20.

Tashiro K, Doi S, Moriwaka F, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy with magnetic resonance imaging verification and therapeutic trials with interferon. *J Neurol* 1987;234(6):427–9.

Tassie JM, Gasnault J, Bentata M, et al. Survival improvement of AIDS-related progressive multifocal leukoencephalopathy in the era of protease inhibitors. *Clinical Epidemiology Group. French Hospital Database on HIV. AIDS* 1999;13(14):1881–7.

Terrier B, Martinez V, Seilhean D, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy mimicking cerebral vasculitis in systemic granulomatosis. *J Infect* 2007;54(3):e133–5.

Thurnher MM, Thurnher SA, Muhlbauer B, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy in AIDS: initial and follow-up CT and MRI. *Neuroradiology* 1997;39(9):611–8.

Tuccori M et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy: a report of three cases in HIV-negative patients with non-Hodgkin's lymphomas treated with rituximab. *Ann Hematol* 2009A.

Tuccori M, et al., Re: Rituximab maintenance for the treatment of patients with follicular lymphoma: systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2009B;101:1288-9.

Van Oers MHJ et al. Chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (Rituximab; Mabthera®) in remission induction and maintenance treatment of relapsed/resistant follicular non-

Hodgkin's lymphoma: final analysis of a phase III randomized intergroup clinical trial [abstract no. 353 plus oral presentation]. *Blood* 2005; 106 (11 Part 1): 107.

Venkataramana A, Pardo CA, McArthur JC, et al. Immune reconstitution inflammatory syndrome in the CNS of HIV-infected patients. *Neurology* 2006;67(3):383–8.

Viallard JF, Lazaro E, Lafon ME, et al. Successful cidofovir therapy of progressive multifocal leukoencephalopathy preceding angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2005;46(11):1659–62.

Vidal L, et al. Rituximab maintenance for the treatment of patients with follicular lymphoma: systematic review and meta-analysis of randomized trials. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:248-55.

Vollmer-Haase J, Young P, Ringelstein EB. Efficacy of camptothecin in progressive multifocal leukoencephalopathy. *Lancet* 1997;349:1366.

von Einsiedel RW, Fife TD, Aksamit AJ, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy in AIDS: a clinicopathologic study and review of the literature. *J Neurol* 1993;240:391–406.

Weber T, Beck R, Stark E, et al. Comparative analysis of intrathecal antibody synthesis and DNA amplification for the diagnosis of cytomegalovirus infection of the central nervous system in AIDS patients. *J Neurol* 1994;241(7):407–14.

Weber T, Major EO. Progressive multifocal leukoencephalopathy: molecular biology, pathogenesis and clinical impact. *Intervirology* 1997;40(2–3):98–111.

Weber T, Trebst C, Frye S, et al. Analysis of the systemic and intrathecal humoral immune response in progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Infect Dis* 1997;176(1):250–4.

Weber T, Turner RW, Frye S, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy diagnosed by amplification of JC virus-specific DNA from cerebrospinal fluid. *AIDS* 1994;8:49–57.

- Weber T, Turner RW, Frye S, et al. Specific diagnosis of progressive multifocal leukoencephalopathy by polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1994;169:1138–41.
- Weber T, Weber F, Petry H, et al. Immune response in progressive multifocal leukoencephalopathy: An overview. *J Neurovirol* 2001;7(4):311–7.
- Weber T. Cerebrospinal fluid analysis for the diagnosis of human immunodeficiency virus-related neurologic diseases. *Semin Neurol* 1999;19:223–33.
- Weber T. Laboratory findings in progressive multifocal leukoencephalopathy. In :Kahalili K, Stoner GL, editors. *Human polyomaviruses molecular and clinical perspectives*. New York: Wiley-Lis; 2001. p. 337–58.
- Weck PK, Buddin DA, Whisnant JK. Interferons in the treatment of genital human papillomavirus infections. *Am J Med* 1988;85(2A):159–64.
- White MK, Gordon J, Reiss K, et al. Human polyomaviruses and brain tumors. *Brain Res Brain Res Rev* 2005;50:69–85.
- Whiteman ML, Post MJ, Berger JR, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy in 47 HIV-seropositive patients: neuroimaging with clinical and pathologic correlation. *Radiology* 1993;187:233–40.
- Wierda W et al. chemoimmunotherapy with fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab for relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2005 Jun 20; 23 (18): 4070-8.
- Willoughby E, Price RW, Padgett BL, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML): in vitro cell-mediated immune responses to mitogens and JC virus. *Neurology* 1980;30(3):256–62.

Wyen C, Hoffmann C, Schmeisser N, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy in patients on highly active antiretroviral therapy: survival and risk factors of death. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004;37(2):1263–8.

Yiannoutsos CT, Major EO, Curfman B, et al. Relation of JC virus DNA in the cerebrospinal fluid to survival in acquired immunodeficiency syndrome patients with biopsyproven progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann Neurol* 1999;45(6):816–21.

Yousry TA, Major EO, Ryschkewitsch C, et al. Evaluation of patients treated with natalizumab for progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med* 2006;354(9):924–33.

Zheng HY, Kitamura T, Takasaka T, et al. Unambiguous identification of JC polyomavirus strains transmitted from parents to children. *Arch Virol* 2004;149(2):261–73.

Zu Rhein G, Padgett BL, Walker DL, et al. Pituitary function after removal of microadenomas for Cushing's disease [letter]. *N Engl J Med* 1978;299(5):256–7.

GLOSSARIO

- ❖ ANC: conta assoluta dei neutrofili
- ❖ BVAC
- ❖ CHOP: ciclofosfamide, doxorubicina, vincristina e prednisone
- ❖ C-MOPP: ciclofosfamide, mecloretamina, vincristina, procarbazina e prednisone
- ❖ CPA:
- ❖ CSF: fluido cerebrospinale
- ❖ CTL: linfociti T citotossici
- ❖ CVP: ciclofosfamide, vincristina e prednisone
- ❖ DFS: sopravvivenza libera da malattia
- ❖ DICE: desametasone, ifosfamide, carboplatino ed etoposide
- ❖ DICEP: ciclofosfamide, etoposide e cisplatino
- ❖ DLBCL: linfoma a cellule B diffuse
- ❖ DRX:
- ❖ EFS: sopravvivenza libera da eventi
- ❖ FCM: fludarabina, ciclofosfamide e mitoxantrone
- ❖ GBM: glioblastoma multiforme
- ❖ HAART: Highly Active Antiretroviral Therapy
- ❖ H-MRS: spettroscopia protonica a risonanza magnetica
- ❖ IPI: Indice Prognostico Internazionale
- ❖ IRIS: Sindrome Infiammatori da Immunoricostituzione
- ❖ LCM: linfoma delle cellule mantellari
- ❖ LES: lupus eritematoso sistemico
- ❖ LLC: Leucemia Linfocitica Cronica
- ❖ LNH: linfoma non-Hodgkin
- ❖ MCP: mitoxantrone, clorambucile e prednisone
- ❖ MRI: imaging a risonanza magnetica
- ❖ MS: sclerosi multipla
- ❖ NAA: N-acetil-aspartato
- ❖ ORI: origine di replicazione
- ❖ OS: overall serviva
- ❖ PBSCs: cellule staminali del sangue periferico
- ❖ PML: Leucoencefalopatia multifocale progressiva
- ❖ PNET: tumore neuro-ectodermico medulloblastoma/primitivo
- ❖ R-FLUDA: rituximab e fludarabina
- ❖ VLP: particelle virus-simili